



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE - CCBS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF

**Bioacumulação de metais presentes no material
particulado atmosférico sedimentável em tilápia-do-
Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

Aluno: William Manuel Pereira Antunes Fortes

Orientadora: Prof^a Dra. Marisa Narciso Fernandes

Co-orientadora: Dra. Iara da Costa Souza

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato William Manuel Pereira Antunes Fortes, realizada em 25/02/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Profa. Dra. Sílvia Tamie Matsumoto (UFES)

Profa. Dra. Mariana Morozesk (UFRPE)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a duas das pessoas mais importantes na minha vida sem as quais eu não estaria aqui, meus pais Lucília e Manuel Fortes. Palavras não são o suficiente para descrever a eterna gratidão de ser filho destas pessoas magníficas, virtuosas, cujo carinho, amor, educação, dedicação e muita paciência me permitiram chegar onde estou hoje. Agradeço ainda aos meus irmãos Júlio e Ana, pessoas também muito especiais com grandes corações que sempre me apoiaram (e aturaram) e fizeram aquele papel de irmão mais velho com excelência! Hoje a distância nos separa, mas levarei sempre uma parte de vocês comigo para todo o sempre.

Agradeço à querida Professora Marisa Fernandes, pela oportunidade, por abrir as portas do laboratório, pela orientação e principalmente pela paciência que foram fundamentais para que este trabalho saísse!

Agradeço ainda à Doutora Iara pela participação neste processo de aprendizado que foi o mestrado. Pela amizade, pelos ensinamentos e pelo entusiasmo contagiante pela temática.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço aos grandes amigos Nádia, Renan e Caroline por todo o apoio e pela companhia nas horas que mais precisei (e horas ajudando no laboratório também)! Por acreditarem em mim e me incentivarem a ir além! Não podia deixar de faltar ainda um agradecimento às amigas Thalita e Isadora por tudo e pelos rolês!!

Um grande agradecimento ao pessoal do lab que ajudaram nas coletas, na elaboração do trabalho, nos momentos de frustração e principalmente nos momentos de felicidade: Carol, Gustavo, NatáliaS (conhecidas como Portruneli e Viana), Michelle, Fabricio, Israel, Henrique, Driele, Lívia, Seu anjelo.

Ao Matheus (Panda) da química (e ao grupo GAIA) que sem ele muita coisa teria demorado 5x mais. Obrigado pela disponibilidade e pela paciência (e pelos materiais)!

Ao pessoal da minha república, Mário, Jo, Brunão, Fosti, XV, Guga, Salsicha, Maycon, por me terem acolhido quando vim de tão longe para cá. Pela experiência de conviver com pessoas tão diferentes, cada um com sua vivência e jeito, pelas jantãs em família, pelos roles de quinta, pelas amizades. E claro à Laika pelo carinho canino e por nos manter seguro (mesmo as 5 da manhã).

Ao Alexandre, secretário do programa, que a esta altura do campeonato já deve estar farto de tanto email meu! Obrigado pela paciência e ajuda!

Ao pessoal do Espírito Santo pela ajuda e pelo seu trabalho exemplar!

Aos meus amigos de longa data de Cabo Verde cuja vida adulta nos fez seguir rumos diferentes, uma palavra define: "Sodade". Obrigado por tudo e um brinde.

Como não podia deixar de faltar, as minhas dez sementes no meio do atlântico, minha pátria que me orgulho, Cabo Verde. Meu lar por 18 anos, lugar o qual não importa onde eu vá no futuro continuarei chamando de casa e jamais esquecerei

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1. Contextualização.....	1
1.2. Cenário Brasileiro.....	3
1.3. Biocumulação.....	5
1.4. Biomarcadores.....	5
1.5. Efeitos em seres vivos.....	6
2. Objetivos.....	8
2.1. Objetivos gerais	8
2.2. Objetivos específicos	8
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Coleta material atmosférico particulado sedimentável.....	9
3.2. Coleta e aclimatação de peixe.....	9
3.3. Delineamento experimental e ensaio de bioacumulação.....	11
3.3.1. Eutanásia e coleta de amostras.....	13
3.3.2. Análise das variáveis químicas e físicas da água.....	13
3.3.3. Processamento e análise Multielementar da água e amostra biológica.....	14
3.3.4. Controle de qualidade da análise multielementar.....	14
3.3.5. Fator de Biococentração.....	15
3.3.6. Análise das brânquias.....	15
3.3.6.1. Processamento e Análises histológicas.....	15
3.3.6.2. Determinação da concentração da Metalotioneína.....	17
3.3.7. Análise estatística.....	18
4. Resultados.....	19
4.1. Parâmetros de qualidade água e dados biométricos dos animais.....	19
4.2. Concentração de Metais no Material particulado atmosférico sedimentável.....	19
4.3. Concentração de metais na água nos grupos controle e expostos ao MPAS	21
4.4. Concentração ($\mu\text{g/g}$) dos metais Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb nas vísceras e filé de <i>O. niloticus</i>	29
4.4.1. Cobre.....	29
4.4.2. Ferro.....	31
4.4.3. Alumínio.....	33
4.4.4. Zinco	35

4.4.5. Manganês.....	37
4.4.6. Chumbo.....	39
4.5. Fator de bioacumulação.....	41
4.6. Biomarcadores nas brânquias de <i>O. niloticus</i>	43
4.6.1. Metalotioneína em brânquias de <i>O. niloticus</i>	43
4.6.2. Histopatologias em brânquias de <i>O. niloticus</i>	44
4.7. Correlação de Spearman.....	48
5. Discussão.....	51
5.1. Parâmetros Físicos e químicos da água e Solubilidade MPAS.....	51
5.2. Dinâmica de bioacumulação de metais.....	52
5.2.1. Bioacumulação.....	52
5.2.2. Padrão de bioacumulação.....	55
5.2.3. Limites diários e saúde humana.....	57
5.3. Biomarcadores nas brânquias de <i>O. niloticus</i>	58
5.3.1. Metalotioneínas.....	58
5.3.2. Histopatologias.....	59
6. Conclusões	61
7. Referências.....	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Região do complexo de Tubarão em Vitória.....	10
FIGURA 2: Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i>	10
FIGURA 3: Concentração de Cu ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos.....	23
FIGURA 4: Concentração de Fe ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos.....	24
FIGURA 5: Concentração de Al ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos.....	25
FIGURA 6: Concentração de Zn ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos.....	26
FIGURA 7: Concentração de Mn ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos.....	27
FIGURA 8: Concentração de Pb ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos.....	28
FIGURA 9: Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Cu nas vísceras e filé de <i>O. niloticus</i> ao longo de 30 dias.....	30
FIGURA 10: Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Fe nas vísceras e filé de <i>O. niloticus</i> ao longo de 30 dias.....	32
FIGURA 11: Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Al nas vísceras e filé de <i>O. niloticus</i> ao longo de 30 dias.....	34
FIGURA 12: Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Zn nas vísceras e filé de <i>O. niloticus</i> ao longo de 30 dias.....	36
FIGURA 13: Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Mn nas vísceras e filé de <i>O. niloticus</i> ao longo de 30 dias.....	38
FIGURA 14: Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Pb nas vísceras e filé de <i>O. niloticus</i> ao longo de 30 dias.....	40
FIGURA 15: Variação da concentração de metalotioneína (ng de MT/mg de proteína) nas amostras de brânquias de <i>O. niloticus</i> ao longo dos 30 dias de experimento.....	44

FIGURA 16: Alterações histológicas das brânquias e sua variação ao longo dos dias 0 (A e B, controle e exposto respectivamente), 12 (C e D, controle e exposto respectivamente) e 30 (E e F, controle e exposto respectivamente). Setas pretas indicam hipertrofia do epitélio lamelar; * indica hipertrofia das células cloreto.....45

FIGURA 17: Variação do IAH de brânquias, expresso em média, ao longo dos dias e diferenças entre grupos47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Aplicações de Nanopartículas/nanomateriais metálicas.....	1
TABELA 2: Síntese Delineamento experimental de exposição.....	12
TABELA 3: Patologias consideradas para avaliação de alterações histológicas e seus estágios de comprometimento das Brânquias.....	17
TABELA 4: Parâmetros de qualidade da água dos experimentos: grupo Controle e Expostos, expressos em média + desvio padrão.....	19
TABELA 5: Concentração de metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) presentes no MPAS. Concentrações de metais presentes no lote de MPAS coletado na estação seca (Abril a Agosto) de 2018. Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) são dados para cada metal.....	20
TABELA 6: Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dos metais Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb na água dos grupos Controle e Exposto ao pó preto durante o experimento. A concentração dos metais no grupo Controle não apresentou diferenças significativas estão apresentadas como média e erro padrão. No grupo Exposto são dadas a concentração nominal e concentrações reais dos metais na água.....	22
TABELA 7: Concentração de Cu ($\mu\text{g.L}^{-1}$) na água e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição.....	29
TABELA 8: Concentração de Fe na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição.....	31
TABELA 9: Concentração de Al na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição.....	33

TABELA 10: Concentração de Zn na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição.....	35
TABELA 11: Concentração de Mn na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição.....	37
TABELA 12: Concentração de Pb na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de <i>Oreochromis niloticus</i> dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição.....	39
TABELA 13: Valores de BCF para Cu, Fe, Al, Mn, Pb e Zn nas amostras peixes do grupo exposto ao MPAS.....	42
TABELA 14: Concentrações de metalotioneinas presentes nas diferentes amostras.....	43
TABELA 15: Frequência (%) das alterações Histopatológicas registradas nas brânquias de <i>O. niloticus</i> nos grupos controle e exposto ao MPAS.....	46
TABELA 16: Índice de alteração histológica para amostras de Brânquia do grupo Controle e Exposto.....	47
TABELA 17: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras contendo Cu com Biomarcadores.....	48
TABELA 18: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras contendo Fe com Biomarcadores.....	48
TABELA 19: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras contendo Al com Biomarcadores.....	49
TABELA 20: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras contendo Zn com Biomarcadores.....	49
TABELA 21: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras contendo Mn com Biomarcadores.....	50

TABELA 22: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras contendo Pb com Biomarcadores.....50

TABELA 23: Comparação entre o limite diário (mg) estabelecido pela USEPA (USEPA 2020) e o consumo estimado de Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb (mg) presente em 150 g de filé ou vísceras considerando a maior concentração determinada e a concentração referente ao dia 30 para cada metal.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag = Prata

Al = Alumínio

AlO = Óxido de alumínio

As = Arsênio

B = Boro

Ba = Bário

Bi = Bismuto

Cd = Cádmio

Ce = Cério

CeO₂ = Óxido de cério

CH: amostras de água grupo controle

CF: amostras filé controle

Cr = Cromo

Cu = Cobre

CV: amostras vísceras controle

DOM: material orgânico dissolvido

EH: amostras de água grupo exposto ao MPAS

EV: amostras vísceras grupo exposto ao MPAS

EM: amostras filé exposto ao MPAS

Fe = Ferro

FeO = Óxido de ferro

GSH = Glutathiona

GST = Glutathiona S-transferase

Hg = Mercúrio

IAH = Índice Alteração Histopatológica

MPAS = Material Particulado Atmosférico

La = Lantânio

LOD = Limite detecção

LOQ = Limite quantificação

MT = Metalotioneínas

Ni = Níquel

Nb = Nióbio

Pb = Chumbo

Rb = Rubídio

Se = Selênio

SOD = Superóxido dismutase

Sr = Estrôncio

Sn = Estanho

Ta = Tântalo

Ti = Titânio

V = Vanádio

W = Tungstênio

Y = Ítrio

Zn = Zinco

ZnO = Óxido de zinco

Zr = Zircônio

RESUMO

A produção de material particulado atmosférico sedimentável (MPAS) contendo metais e nanopartículas metálicas vem aumentando no mundo, ocasionando a contaminação de ambientes aquáticos, como é o caso do Estado do Espírito Santo, localizado na região Sudeste do Brasil. MPAS foi coletado na região de Vitória, ES, para avaliar o padrão de bioacumulação dos metais em *Oreochromis niloticus* e seus possíveis efeitos nas brânquias. O perfil químico do MPAS foi analisado e, posteriormente, exemplares de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foram expostos ao MPAS (1 g.L^{-1}) em sistema semi-estático, por 30 dias, com coleta diária de amostra de água para análise dos parâmetros físicoquímicos e perfil químico dos metais dissolvidos. A cada 3 dias, espécimes de tilápia foram coletados para análise de bioacumulação (total: 11 coletas) de metais nas vísceras e filé, e a cada 6 dias foram coletados espécimes para análises histológicas e determinação da concentração de metalotioneína das brânquias (Total: 6 coletas). Para a análise multielementar, as amostras foram digeridas e a concentração dos metais determinada por ICP-MS (espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplada). Foram identificados e quantificados os seguintes metais: B, Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, Pb, Hg, Ba, Bi, W, Ti, Zr, Y, La, Nb, Ce no MPAS. Ta foi identificado, mas não quantificado. Nas vísceras e filé dos animais foram avaliados a bioacumulação seis metais (Cu, Fe, Al, Zn, Mn, Pb) com maior concentração no MPAS e limites determinados na legislação brasileira. A concentração de Cu na água foi superior aos limites estabelecidos legislação para águas dulcícolas do dia 3 ao dia 15 e no dia 24. A concentração de Fe foi superior do dia 3 ao dia 12. No caso do Al, a concentração foi superior todos os dias, exceto no 18º. dia e a concentração de Pb só ultrapassou o limite no 6º. dia. O fator de bioconcentração (BCF) foi acima de 1 para todos os metais analisados confirmando a bioacumulação na espécie estudada. Alguns metais como por exemplo Al, Fe, Mn e Pb apresentaram padrões de acumulação semelhantes com aumento significativo na concentração nos primeiros dias até atingir um pico, seguido pela diminuição subsequente. O Cu e Zn apresentaram um padrão de bioacumulação com diversos picos e persistência de uma alta concentração ao longo da exposição. Houve bioacumulação preferencial de metais nos tecidos viscerais quando comparados ao filé. A análise das histopatologias e da concentração de metalotioneína nas brânquias não apresentaram alterações após exposição ao MPAS. Prevê-se que concentrações superiores de MPAS desencadeie respostas mais graves.

Palavras-chave: bioacumulação de metais; vísceras; filé; histopatologia; ICP-MS; metalotioneína, brânquia.

ABSTRACT

The occurrence of sedimentary atmospheric particulate matter (MPAS) containing metals and metallic nanoparticles has increased in the world, causing the contamination of aquatic environments, as is the case for Espírito Santo, southeast region of Brazil. MPAS was collected in Vitória's bay surroundings, ES, to evaluate the bioaccumulation pattern of metals in *Oreochromis niloticus* and its possible effects on the gills. The metal profile of MPAS was analyzed and, subsequently, specimens of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* were exposed to MPAS (1g/L) in a semi-static system, for 30 days, with daily sampling of water for physicochemical parameters analysis and chemical profiling of the dissolved metals. Every 3 days, specimens of tilapia were picked for analysis of bioaccumulation (Total: 11 sample collection) of metals in the viscera and fillet, and every 6 days specimens were picked for histological analysis and determination of the metallothionein concentration in gills (Total: 6 sample collection). For the multi-element analysis, the samples were prepared by acid digestion method and the concentration of metals determined by ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry). The following metals were identified and quantified: B, Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, Pb, Hg, Ba, Bi, W, Ti, Zr, Y, La, Nb, Ce in the MPAS. Ta has been identified but not quantified. Six metals (Cu, Fe, Al, Zn, Mn, Pb) were chosen/picked for analysis in the fish's viscera and fillet based on the following criteria: higher concentration in MPAS and limits determined by Brazilian and USA legislation. The concentration of Cu in water was higher than the limits established for freshwater from day 3 to day 15 and on day 24. The concentration of Fe was higher from day 3 to day 12. Al concentration was higher on all days, except on the 18th day. Pb's concentration only exceeded the limit on the 6th day. The determined bioconcentration factor (BCF) was >1 for all metals analyzed, confirming their bioaccumulation in tilapia. Some metals such as Al, Fe, Mn and Pb showed similar accumulation patterns with significant increase in concentration in the first days until reaching a peak, followed by the subsequent decrease. Cu and Zn showed different bioaccumulation pattern with several peaks and persistence of a high concentration throughout the exposure. There was preferential bioaccumulation of those metals in the viscera compared to the fillet. The analysis of histopathology and the concentration of metallothionein in the gills showed no significant alteration after exposure to MPAS. Exposure to higher concentrations of MPAS may trigger more severe responses.

Keywords: metal bioaccumulation; gut; fillet; ICP-MS; histopathology; metallothionein; gills.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

A evolução tecnológica no último século permitiu melhores condições de vida para a humanidade ao longo dos anos (UNITED NATIONS, 2017). Com o crescimento da tecnologia, verifica-se um aumento na demanda por insumos para subsistência e, concomitantemente, um aumento na contaminação ambiental, principalmente de corpos hídricos. Historicamente os maiores destaques na contaminação hídrica se associam ao uso excessivo de defensivos agrícolas (AGARWAL et al., 2015). Todavia, novas categorias de contaminantes vem ganhando destaque como é o caso de metais, derivados e nanomateriais metálicos (YOKEL; MACPHAIL, 2011).

Nanomateriais são definidos como materiais com pelo menos uma das dimensões (largura, comprimento ou espessura) entre 1 e 100 nm (KUMAR et al., 2018). As nanopartículas (NP) apresentam propriedades únicas, e por vezes distintas, quando comparados aos seus homólogos em estado dissolvido ou aglomerado tais como tamanho, área de superfície, superfície de reação, configuração e carga. Estas propriedades garantiram a aplicação das NP metálicas em diversas áreas de interesse, como por exemplo, cosméticos, fármacos e indústria (Tabela 1) (BUNDSCHUH et al., 2018).

TABELA 1: Aplicações de nanopartículas/nanomateriais metálicas (adaptado de SHAW; HANDY, 2011)

Nanopartículas ou nanomateriais	Aplicações
Óxido de alumínio	Cosméticos, vestuário, polimento de superfícies ópticas
Ouro	Administração de medicamentos, suplementos minerais, detecção de risco biológico (ricina, <i>E. coli</i>)
Prata	Bactericida em grupo de água, vestuário, brinquedos, curativos, contraceptivos e pasta de dente
Dióxido de Titânio	Tintas, protetores solares, cosméticos, materiais construção, antimicrobiano, equipamentos esportivos

Nas últimas décadas, os produtos contendo NP metálicas ou insumos tem aumentado consideravelmente (BUNDSCHUH et al., 2018). Paralelamente a esse aumento na produção, há um aumento considerável de estudos técnicos destes materiais de origem antrópica no ambiente (PART et al., 2018). A introdução destes materiais no ambiente pode ocorrer por diversas vias, como o descarte impróprio de resíduos industriais direto na água, derrames durante transporte, manuseio e armazenamento (PART et al., 2018), aplicação de biosólidos, lixiviação de aterros (LEAD et al., 2018), efluentes de estações tratamento reutilizados em atividades agrícolas (LIU et al., 2018) e resíduos de atividade mineradora (transporte minério, resíduos metálicos) (DUARTE et al., 2019).

A concentração ambiental destas partículas varia de acordo com características do meio que estão inseridas, de forma que pesquisadores optam pela modelagem probabilística para estimativa do fluxo destes materiais no ambiente (GIESE et al., 2018; KELLER; LAZAREVA, 2013). As altas concentrações em diferentes ambientes: aéreo, terrestre ou aquático decorrem da utilização de NP metálicas em diversos produtos ou setores industriais a partir dos quais difundem-se para o ambiente (KELLER et al., 2013).

Além da presença no ambiente em forma de NP, outras formas do metal são encontradas. Nas últimas décadas, a maior atenção reside nos metais pesados. Introduzidos na biosfera por rotas semelhantes às das NP, os metais ocupam diversas esferas ambientais (aéreas, aquáticas e terrestres). A presença de cromo no ambiente por exemplo está relacionado principalmente com indústrias de couro; fertilizantes químicos muitas vezes contem na sua formulação metais como As, Cd, Pb, Ni, Mn (entre outros)(MISHRA; BHARAGAVA; MORE, 2019).

O uso de águas residuais não tratadas, contendo metais, constituem outra rota de contaminação ambiental. REZAPOUR et al. (2019) comparam a acumulação de metais em locais irrigados por águas residuais tratadas e não tratadas na região da cidade de Úrmia, nordeste do Irã e mostraram concentrações de Cd, Ni, Cu, Zn, e Pb nos solos irrigados com águas residuais não tratadas superiores aos solos irrigados com águas tratadas (178,2 %, 105,1%, 66,4%, 66% e 40,9% respectivamente) e a presença destes metais no trigo *Triticum aestivum* L., concentrando principalmente em raízes.

A presença de metais na água é relatada por autores em diferentes países. ABDEL-SATAR et al. (2017) avaliaram a qualidade da água do rio Nilo, Egito, em diferentes localidades e constataram a presença de diversos metais como Fe, Mn, Zn, Ni, Cu em concentrações superiores aos limites estabelecidos associando à grande atividade antropogênica na localidade. WANG et al.(2018) apontaram a presença de Cd, Ni, Cr, Cu, Al em reservatórios aquíferos na região sul da China, com o Al apresentando concentrações acima do permitido para os limites

estabelecidos em algumas localidades. Uma vez no ambiente, metais, NP e derivados podem bioacumular e/ou biomagnificar na biota provocando efeitos tóxicos em diferentes níveis.

A bioacumulação/bioconcentração é definida como a transferência de contaminantes do meio externo para um organismo, nos quais são observadas concentrações teciduais superior a do meio ambiente (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003a). A biomagnificação corresponde a um aumento na concentração dos contaminantes nos organismos na medida que se encontram em um nível trófico superior (FERNICOLA et al. 2003). Ambos eventos foram relatados na região de mangue no Espírito Santo por SOUZA et al. (2013, 2018a e 2021b) para metais e NP. Os autores comprovaram e estabeleceram a correlação entre metais detectados na água e sedimento com as concentrações determinadas no peixe *Centropomus parallelus*. O estudo comparou ainda a variação temporal (verão e inverno) dos metais constatando a manutenção da correlação descrita. Desse modo, o consumo da biota exposta a ambientes poluídos, e por períodos prolongados, pode se apresentar como uma nova rota de exposição a metais em humanos, configurando-se como problema de saúde pública.

1.2. Cenário Brasileiro

No Brasil a poluição por metais e metalóides constitui uma realidade que vem se agravando com os anos devido à forte atividade industrial, urbana e portuária (translado de minério e afins). CHIBA et al. (2011) relataram, na estação chuvosa, a presença de Cd ($0,015 \text{ mg.L}^{-1}$), Pb ($0,134 \text{ mg.L}^{-1}$), Cu ($0,014 \text{ mg.L}^{-1}$) e Ni ($0,040 \text{ mg.L}^{-1}$) em águas superficiais da região de São Carlos - SP, em 2010, e níveis altos de Cr ($43,25 \text{ mg.kg}^{-1}$) Ni ($18,80 \text{ mg.kg}^{-1}$) e Cu ($35,98 \text{ mg.kg}^{-1}$) em sedimentos durante a estação chuvosa, concentrações acima do permitido para águas de classe 3 (CONAMA 357/05, 2005) e para sedimentos de nível 1 (CONAMA 344/04, 2004). O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) caracteriza como classe 3 os corpos hídricos destinados ao abastecimento humano, após tratamento convencional ou avançado; irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário e dessedentação de animais.

Na região da cidade de Carambei, Paraná, em 2015 pertencente a Bacia de São João, foram reportados Cromo, Cd e Pb em concentrações acima do recomendado: 3,1–10,7, 2,1–5,5, 5,0–28,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente para amostras de sedimento e 3,7–33,2, 6,3–14,2, 5,0–57,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em amostras de água (DA SILVA; DA SILVEIRA; DE CAMPOS, 2017).

TREVIZANI et al. (2019) relataram a contaminação por metais nos peixes *Stellifer rastrifer* (Cangoá), *Paralonchurus brasiliensis* (Maria-Luisa), e *Isopisthus parvipinnis*, presentes em estuários no sul e sudeste brasileiro: complexo Estuarino de Paranágua (PEC, PR), complexo estuarino-lagoa de Cananéia-Iguapé (CIELC, SP), complexo Santos-São Vicente (SSVEC, SP), caracterizados pela densa urbanização e presença de áreas portuárias. Dentre os resultados, as concentrações de As, Cr, Pb e Se em todas as espécies de todos os estuários, excederam o máximo permitido para consumo humano. Além disso, a concentração de Zn na água do complexo PEC excedeu o limite de concentração permitido. Sendo regiões de alto interesse para comunidades pesqueiras, e de diversidade, a situação descrita realça a necessidade de monitoramento das concentrações de metais e metalóides.

No sudeste brasileiro, a região costeira do Espírito Santo vem sofrendo com contaminação por metais devido a atividade de indústrias metalúrgicas (complexos de mineração, siderurgia, pelotização de minério de ferro e exportação). Souza et al. (2013) relatou a contaminação da Baía de Vitória e Santa Cruz (ES) e o acúmulo de metais (Fe, Pb, As, Hg, Cr e Cu) em músculo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). Outros estudos na região evidenciaram ainda o acúmulo de metais em diferentes espécies de planta (*Laguncularia*

racemosa, *Rhizophora mangle* e *Avicennias chaueriana*) presentes no mangue nas mesmas regiões (SOUZA et al., 2014a, 2014b, 2015).

A contaminação desses ambientes estuarinos por metais/metaloídeos pode ser decorrente de diferentes fontes, dentre as quais, as partículas metálicas oriundas do ar atmosférico, o conhecido “pó preto”, como foi demonstrado em plantas de mangue (ARRIVABENE et al., 2015) e em estudos de análise ambiental forense isotópicas (SOUZA et al, 2018b) e nanocristalográficas (SOUZA et al, 2019) e afetam diretamente os corpos hídricos. SOUZA et al. (2018b) mostrou por meio da análise isotópica de carbono, nitrogênio, estrôncio e chumbo que a origem desses metais na cadeia trófica do ecossistema estuarino da Baía de Vitória e Santa são os metais presentes no material particulado atmosférico sedimentável (MPAS) oriundo de atividade minero-siderúrgica, e que a transferência desses ao longo da cadeia trófica é fortemente influenciada pela água superficial contaminada pela deposição crônica do material particulado.

SOUZA et al. (2019) relatou também a presença de NP de titânio (TiO_2 -NP) no núcleo e citoplasma de células de diferentes tecidos de *Centropomus parallelus*. Essas NP decorreriam da exposição da biota ao MPAS citado anteriormente como pó preto e em 2021, SOUZA et al demonstrou essa nova rota de exposição e bioacumulação dos metais nos seres vivos decorrentes da contaminação por MPAS.

1.3. Bioacumulação

Os organismos presentes nos corpos hídricos possuem diferentes longevidades e hábitos e muitos se mantem por longos períodos em um mesmo local. Um fator importante a ser considerado nestas situações é o potencial de bioacumulação destes metais na biota exposta por períodos prolongados.

O fenômeno de bioacumulação de metais e derivados é uma temática de interesse mundial. HAO et al. (2019) estudaram a dinâmica de bioacumulação de metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb, Hg e Zn) em regiões costeiras da China, avaliando a presença dos metais em peixes e caranguejo. Cu e Zn apresentaram fatores de bioacumulação (BAF) maiores quando comparados aos demais metais.

A bioacumulação de materiais é um processo complexo que não ocorre de forma simples e direta, estando sujeito a influência de diversos fatores (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003a) tais como:

- Fenômeno de transporte ativo;
- Influência do comportamento de difusão por membranas celulares;

- Diferentes taxas de metabolismo por organismos diferentes e comportamento de acumulação dos metabólitos;
- Acumulação em órgãos e tecidos específicos, além de adsorção em superfícies biológicas como brânquias e pele;
- Propriedades estruturais especiais (substâncias anfifílicas, taxa dissociação);
- Cinética de captação e depuração, níveis restantes de substâncias ou metabólitos após depuração;

O aumento da concentração destes metais nos tecidos dos organismos caracteriza uma situação alarmante em vista dos potenciais efeitos negativos sobre a fisiologia dos organismos expostos. Neste contexto, marcadores biológicos auxiliam a elucidar o impacto do poluente sobre o organismo.

1.4. Biomarcadores

Biomarcadores são definidos como alterações a níveis morfológicos, fisiológicos e bioquímicos possíveis de serem mensurados e associados com patologias e representam uma ferramenta importante para avaliar qualidade ambiental e níveis de poluição (KROON; STRETTEN; HARRIES, 2017). Baixas concentrações de oxigênio dissolvido ambiental (hipóxia) podem afetar a sobrevivência do animal e causam alterações em marcadores como aumento nos níveis de cortisol, parâmetros hematológicos e imunológicos, histopatologias branquiais, estresse oxidativo entre outros (ABDEL-TAWWAB et al., 2019). BONOMO et al. (2021) estudaram os efeitos do insecticida MgHP no peixe *Prochilodus lineatus* avaliando alterações em marcadores hematológicos, citogenéticos e de estresse oxidativo hepáticos determinando o potencial poluente do composto.

A presença de metais vem sendo monitorada no ambiente e alguns marcadores são comumente utilizados para avaliar o nível de poluição. No fígado destacam-se marcadores como danos no DNA e lisossomais, aumento de nível de metalotioneínas e ferritina e de estresse oxidativo (ARDESHIR; MOVAHEDINIA; RASTGAR, 2017). Nas brânquias, alterações nos níveis de metalotioneínas e respostas oxidativas (MA'RIFAH et al., 2019; SOW et al., 2019) além de alterações histopatológicas (PAULINO et al., 2014) constituem alguns dos marcadores avaliados.

1.5. Efeitos em seres vivos

Nas últimas décadas, diversos tem sido os estudos avaliando a presença de metais nas diferentes esferas ambientais e o possível impacto toxicológico na biota local e eventualmente humana (HARSHA; SENTHIL; PANDA, 2019)

Um estudo realizado na ostra *Crassostrea rivularis*, avaliou o impacto da exposição do Cu em hemócitos reduzindo o número total de hematócitos, a atividade de esterase, conteúdo lisossomal e aumentando a atividade fagocitária e produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente em pH baixo. (HUANG et al., 2018). RASTOGI et al. (2018) relataram os efeitos da exposição ao Cd no fígado e rim do bagre-australiano (*Heteropneustes fossilis*) que causou necrose focal, ruptura do tecido, picnose e vacuolização no fígado e alteração glomerular, necrose celular, picnose e dilatação dos túbulos nos rins. REBOA et al.(2019) avaliaram o impacto que os metais Cu, Zn, Cr, Fe e Mn em peixes coletados no Golfo de Tigullio (Itália) destacando o efeito do Pb e Ni nas brânquias e a ocorrência de hiperplasia epitelial, elevação do epitélio e fusão lamelar como efeito histopatológico.

DUAN et al. (2017) avaliaram o impacto de material particulado (PM) 2,5 na expressão genética e microRNA em *Danio rerio* e concluíram que a exposição embrionária de *Danio rerio* ao PM 2,5 afetou negativamente expressão de genes e microRNA envolvidos na resposta a estresse oxidativo, respostas imunes, ativação de autofagia, hipertensão e desenvolvimento de câncer.

Neste contexto, considerando o potencial toxicológico apresentado por metais e NP metálicas, surge a necessidade de estudos relacionando a contaminação por MPAS e o respetivo impacto ambiental e por conseguinte contribuir para novas diretrizes de prevenção e mitigação.

Sendo assim, este estudo determinou e quantificou os principais elementos constituintes do MPAS. Além de avaliar o padrão de bioacumulação de diferentes metais em vísceras e filé e o efeito da exposição à metais e NP metálicas presentes no MPA em brânquias de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. A escolha da tilápia como modelo experimental se deve à sua plasticidade que permite a adaptação a diferentes ambientes aquáticos (dulcícola e salobra) e resiliência frente a condições abióticas adversas e estressores ambientais. Além disso, a tilápia constitui um importante produto na dieta brasileira com alto valor no mercado piscicultor (VICENTE; ELIAS; FONSECA-ALVES, 2014), de modo que previsão dos efeitos da poluição atmosférica nestes se torna de suma importância econômica.

OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar a bioacumulação de metais e NP metálicas presentes no MPAS no músculo (filé) e vísceras de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e avaliar as alterações morfofuncionais e bioquímicas nas brânquias após exposição por 30 dias ao MPAS.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os elementos químicos (B, Al, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, Pb, Hg) incluindo contaminantes emergentes (Ba, Bi, W, Ti, Zr, Y, La, Nb, Ta, Ce) no MPAS;
- Determinar concentração de Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb na água e no filé e vísceras de *O. niloticus* expostos ao MPAS.
- Quantificar a concentração de metalotioneína nas brânquias de *O. niloticus* expostos ao MPAS
- Avaliar as alterações histopatológicas nas brânquias de *O. niloticus* expostos ao MPAS, considerando a severidade das lesões e o possível comprometimento funcional desses órgãos ao longo da exposição.
- Analisar parâmetros de qualidade da água e morfologia dos peixes após exposição ao MPAS

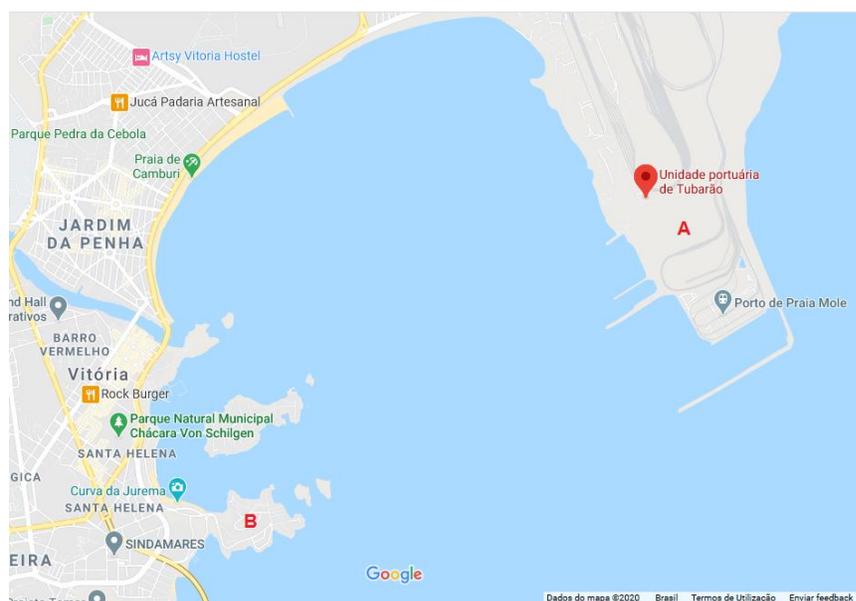
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta material atmosférico particulado sedimentável

O estudo foi desenvolvido com amostras de MPAS coletado na Ilha do Boi próximo ao Complexo Tubarão, Vitória, Espírito Santo, Brasil ($20^{\circ}17'03.8''S$ e $40^{\circ}14'24.9''W$) (Fig. 3). Tubarão é um complexo minero-siderúrgico cujas atividades incluem a pelotização do minério de ferro, produção de aço com diferentes ligas metálicas, estocagem e transporte de minério de ferro e está localizado na área costeira entre a capital Vitória e a cidade Serra.

A Ilha do Boi representa a região de maior influência da fonte fixa (Complexo de Tubarão) e menor influência de fontes móveis, como veículos automotores (SANTOS et al, 2017). O local de coleta selecionado fica a sudoeste da fonte fixa (Complexo de Tubarão) e recebem influência direta das emissões de MPAS dos pátios de estocagem e outras unidades operacionais, como a pelotização do minério de ferro, e siderurgia, as quais são carreadas pela ação de ventos. A Ilha do Boi tem certificação do INMETRO para monitoramento atmosférico e contém estrutura disponibilizada pelo Instituto Estadual de Meio Ambiente (IEMA), Rede Automática de Monitoramento da Qualidade do Ar (RAMQAR) da Grande Vitória/ES cujos dados de monitoramento dos últimos 10 anos serviram de base para a definição desses locais de coletas (SANTOS et al. 2017).

FIGURA 1: Região do complexo de Tubarão em Vitória. Localização de Complexo de Tubarão em Vitória (A) e do ponto de coleta material particulado atmosférico na ilha do Boi (B).



3.2. Coleta e aclimação de tilápia-do-Nilo *O. niloticus*

Neste estudo foram utilizados 222 juvenis de tilápia-do-Nilo *O. niloticus*, de ambos os sexos, pesando em média $1,33 \pm 0,64$ g e medindo $4,33 \pm 0,71$ cm.

FIGURA 2: Exemplar de *Oreochromis niloticus*,



Fonte: www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/2138001/tilapia-em-laboratorio

Classificação sistemática da espécie:

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Sub-Família: Pseudocrenilabrinae

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

A tilápia-do-Nilo constitui uma espécie dulcícola, de médio porte, subtropical-neotropical da família Cichlidae originários da África e sudoeste do Oriente Médio. A dispersão mundial desta espécie iniciou-se em 1930, estando presente como espécie exótica em diversas regiões, inclusive no Brasil. O sucesso da dispersão se deve as características desta espécie como tolerância à alterações ambientais, adaptabilidade trófica e ciclo de reprodução curto. Quanto a alimentação, apesar de serem descritos geralmente como herbívoros, detritívoros e planctívoros

, existem relatos do consumo de ovos, larvas de outros peixes e mesmo pequenos peixes (CANONICO et al., 2005).

Os espécimes de *O. niloticus* foram coletados na Piscicultura Projeto Peixe, em Sales de Oliveira - SP, e foram transferidos para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar, São Carlos, SP. Os animais foram mantidos em tanques com capacidade de aproximadamente 1000 litros com água decolorada, fotoperíodo natural (12h:12h, claro-escuro), aeração constante e alimentação *ad libitum* com ração comercial própria para peixe (ACQUA Fish 28% proteína, SUPRA, Brasil).

3.3. Delineamento experimental e ensaio de bioacumulação

Os peixes foram divididos em 2 grupos (Controle e Exposto). O ensaio de bioacumulação de metais presentes no MPAS foi realizado de acordo com a metodologia descrita por AZEVEDO e CHAZIN (2003), em triplicata, em sistema semi-estático. Espécimes de ambos os grupos foram mantidos em aquários experimentais, com aeração constante, temperatura controlada ($26,6 \pm 0,6^\circ\text{C}$ e $26,2 \pm 0,9^\circ\text{C}$ para os grupos controle e exposto, respectivamente) e renovação da água cuja procedência foi a mesma dos tanques de aclimatação. Os aquários (200 L; 54x81x51 cm) foram isolados com material opaco para mitigar possíveis distúrbios externos. De acordo com testes preliminares, os peixes foram distribuídos nos aquários a razão de 1g-peixe/L de água. Cada grupo (controle e exposto ao MPAS) foi constituído por 111 peixes distribuídos em 3 aquários sendo 37 peixes por aquário.

A concentração de MPAS a ser adicionado na água teve por base a deposição média mensal de MPAS (5 a 20 g MPAS/m²/mês) na região metropolitana da Grande Vitória que pode apresentar picos diários de mais de 1 g por m² (IEMA, 2020). Desta forma, o grupo MPAS foi exposto a concentração de 1 g MPAS.L⁻¹ de água do aquário experimental. O MPAS foi pré-diluindo em béquer com água experimental. Nos aquários do grupo controle não foi adicionado MPAS. Os animais foram expostos ao MPA durante 30 dias. A cada 3 dias, amostra de água foi coletada para análise multielementar e 3 espécimes por grupo (1 em cada aquário) foram coletados para análise de bioacumulação de metais. A cada 6 dias, 13 espécimes por grupo foram coletados para análise das brânquias, sendo 8 para análise de metalotioneína e 5 para análise histológica. Para manter da densidade de peixes nos aquários (1 g-peixe.L⁻¹ água), a cada coleta de animais foi retirada dos aquários volume de água proporcional ao número de espécimes removidos.

Nesse mesmo dia havia renovação de 1/3 da água de cada aquário. A água era removida dos aquários junto com a remoção de material depositado no fundo deles e, em seguida a água era repostada com concentração de MPAS equivalente à concentração inicial nos aquários do grupo MPAS. O mesmo procedimento foi efetuado nos aquários do grupo controle, sendo a água repostada sem adição de MPAS. Os animais foram alimentados sempre no dia anterior a renovação de água fornecendo a mesma ração do período de aclimatação.

Durante os 30 dias de experimento, os parâmetros de qualidade da água foram monitorados e registrados diariamente.

TABELA 2: Síntese do delineamento experimental de exposição

Dia	Atividades				
0	Início Exposição ao MPAS(1g.L⁻¹)	Coleta de Amostras			
	Medida de Parâmetros abióticos	Água	Visceras e Filé	Brânquias	
		Metais	Bioacumulação	Histologia e Metalotioneina	
3		Metais	Bioacumulação		
5		Alimentação			
6		Renovação água	Metais	Bioacumulação	Histologia e Metalotioneina
9			Metais	Bioacumulação	
11		Alimentação			
12		Renovação água	Metais	Bioacumulação	Histologia e Metalotioneina
15			Metais	Bioacumulação	
17		Alimentação			
18		Renovação água	Metais	Bioacumulação	Histologia e Metalotioneina
21			Metais	Bioacumulação	
23		Alimentação			
24		Renovação água	Metais	Bioacumulação	Histologia e Metalotioneina
27			Metais	Bioacumulação	
29		Alimentação			
30	Renovação água	Metais	Bioacumulação	Histologia e Metalotioneina	
	Final Exposição				

3.3.1. Eutanásia e coleta de amostras

Os exemplares de *O. niloticus* coletados foram eutanasiados por overdose anestésica (benzocaína 1g:10L) seguida de secção medular. Parâmetros biométricos dos espécimes foram medidos e registrados.

Dos espécimes para o ensaio de bioacumulação foram coletados dois tipos de amostras:

- Visceras – correspondem a cabeça e todos os órgãos da cavidade interna
- Filé – compreende o tecido muscular e pele.

As amostras coletadas foram armazenadas em freezer (-20 °C) para posterior processamento e análise multielementar e determinação do padrão de bioacumulação.

A separação do peixe em filé e vísceras foi devido a importância que filé possui na dieta de humanos e demais animais. Metais acumulados no filé correspondem aos metais não detoxificados pelo organismo (SOUZA et al., 2013b). As concentrações de metais determinadas nessas amostras foram comparadas aos limites estabelecidos por órgãos regulamentais nacionais como Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e internacionais como Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). O mesmo foi feito nas vísceras, uma vez que são utilizadas na indústria alimentícia (ração animal) e mesmo na dieta humana em algumas localidades.

Para avaliar a ação dos metais foram coletadas as brânquias por serem a principal rota de entrada de contaminantes ambientais em peixes devido ao contato direto e constante com o meio aquático e pelo seu papel fundamental na respiração, equilíbrio ácido-base e iônico (SOUZA et al., 2013a). Para análises histológicas, o segundo e terceiro arco branquial de um lado do animal foram separados cuidadosamente, enxaguados em solução salina (NaCl 0,9%) e, posteriormente fixados em solução de 2,5% glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3. Para o ensaio bioquímico, as brânquias inteiras do animal foram coletadas e imediatamente armazenadas em freezer -80°C.

3.3.2. Análise das variáveis químicas e físicas da água

Os parâmetros físico-químicos da água foram medidos nos aquários controle e exposto no início da exposição e anteriormente a qualquer intervenção experimental. A temperatura, pH e condutividade foram medidos com auxílio de uma sonda multiparâmetro (Orion Star A329 portable, Thermo scientific) com a sonda a meia altura na coluna de água. O oxigênio foi medido

por um oxímetro óptico (Optical oxygen probe Fibox – Pre-sens GmbH) e registrado virtualmente (Software Pre-Sens Oxyview).

3.3.3. Processamento e análise multielementar da água e amostra biológica

As amostras de água coletadas (5mL) foram acidificadas com ácido nítrico sub-boiling na razão de 2% do volume total. Posteriormente estas foram filtradas em filtros de nitrocelulose (0,45 µm) e transferidas para criotubos sendo armazenadas a 4^o até o momento da análise.

As amostras de peixe foram desidratadas em um liofilizador de sublimação a vácuo (Micromodulyo 115, Thermo Electron Corporation, Brasil) até peso constante. Posteriormente essas amostras foram maceradas mecanicamente por graal e pistilo, até obtenção de pó homogêneo. Todas as vidrarias e utensílios foram lavados de acordo com o recomendado no protocolo de US EPA 200. 8 As amostras maceradas foram submetidas ao protocolo de digestão ácida adaptado de Chappaz et al. (2012). As amostras foram pesadas separadamente em tubos de Teflon especiais (hidrofóbicos e resistentes ao calor), procurando obter aproximadamente 0.1 g necessários para o protocolo. Em situações que não era possível, a quantidade pesada respeitava o intervalo indicado de 0.01 a 0.1 g. A digestão ácida foi realizada com a adição de 3 mL ácido nítrico, 0,750 mL clorídrico e 0,250 mL de peróxido de hidrogênio às amostras previamente pesadas. As amostras foram digeridas com o auxílio de uma placa aquecedora de cerâmica (100 °C, 13 horas). Posteriormente foram filtradas (Membrana Nitrato de Celulose Lisa 0,45 µm 13mm) e armazenados a 4°C até análise.

As concentrações de metais foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (Q-ICPMS, Tecnologia Agilent 7500 Series CX) equipada com um ASX-100 autosampler (CETAC Technologies, Omaha, NE, EUA). Esta análise foi realizada no Instituto de Ciências e Tecnologia em Alimentos de Córdoba (YCITAC – Universidad Nacional de Cordoba; Argentina).

3.3.4. Controle de qualidade da análise multielementar

Como controle de qualidade do método de processamento de amostras para análise química, foi efetuado teste de recuperação com material de referência certificado. O material de

referência de tecido de peixe (MR-Agro E3002A, julho de 2020) foi cedido pela Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP, Brasil). A recuperação geral obtida foi de 89.83 ± 18.20 % (média + desvio padrão).

3.3.5. Fator de Bioconcentração (BCF)

O fator de bioconcentração estabelece uma relação entre a concentração de determinado composto presente no organismo e no meio que o mesmo se encontra inserido (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003b).

O cálculo de BCF é definido como:

$$BCF = \frac{\textit{Concentração no organismos}}{\textit{Concentração no sedimento ou água}}$$

No presente estudo, para o cálculo do BCF considerou-se a concentração determinada na água para cada metal e a soma das concentrações determinadas no filé e nas vísceras. Quando a concentração do metal na água foi inferior aos limites de detecção e/ou quantificação estabelecidos para cada metal, o BCF não foi calculado. Valores de BCF acima de 1 mostram a ocorrência de bioconcentração (DALLINGER, 1993).

3.3.6. Análise das brânquias

3.3.6.1. Processamento e Análise histológica das brânquias

As amostras de brânquias fixadas foram desidratadas em bateria crescente de álcool (70%, 80%, 90 e 95%, 1h cada). Após a desidratação, as amostras foram embebidas em historesin (Historesin Embedding kit, Leica, Alemanha) seguindo o protocolo: colocadas em solução de etanol 95% e resina básica (Leica Historesin Embedding kit) na proporção de 1:1 por 4h. Decorrido esse período, as amostras foram transferidas para solução de resina básica pura na qual permaneceram “overnight”, a 4°C. A inclusão das amostras foi efetuada em moldes com adição de solução de resina com endurecedor. A polimerização ocorre em estufa a 37°C, por 24h.

A microtomia das amostras foi realizada em micrótomo eletrônico (HM 360, MICROM, EUA) com lâmina de vidro, em cortes longitudinais de 3 µm de espessura. As lâminas obtidas foram coradas com azul de Toluidina (1 min). A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz (BX 51, Olympus, Denmark) acoplado à computador com obtenção de imagens utilizando o software Olympus DP2 – B5W. As imagens foram analisadas e as alterações histopatológicas foram determinadas de acordo com Poleksic e Mitrovic-Tutunzic (1994).

- Cálculo do Índice de alteração histológica (IAH)

O IAH que indica o grau da funcionalidade do tecido com base na frequência e severidade de cada alteração histológica. Desta forma, às lesões analisadas foram atribuídos graus de severidade com base no comprometimento da função do órgão alvo, traduzindo-se na fórmula:

$$IAH = 1. \sum I + 10. \sum II + 100. \sum III$$

Na qual:

- $\sum I, \sum II, \sum III$ correspondem ao total de alterações em cada grau de severidade,
- 1, 10 e 100 correspondem a fatores de cálculo de IAH para cada grau de severidade respectivamente.

Cada grau de severidade é caracterizado pelo seu impacto na funcionalidade do tecido, sendo associado a cada patologia o estágio de comprometimento do tecido (Tabela 3) (Poleksic e Mitrovic-Tutunzic, 1994), modificado por Cerqueira e Fernandes (2002).

TABELA 3: Patologias consideradas para avaliação de alterações histológicas e estágios de comprometimento das brânquias.

Patologias consideradas	Estágio	Sigla
Hipertrofia do epitélio lamelar	1	HPT
Hiperplasia do epitélio lamelar	1	HPL
Dilatação do canal marginal	1	DCM
Constricção do sistema de células pilares	1	CCP
Fusão parcial de lamelas	1	FPL
Aneurisma lamelar	2	AL
Ruptura epitelial	2	RE
Hipertrofia ionócitos	1	HCC
Proliferação ionócitos	1	PCC
Descolamento epitelial	1	DC

3.3.6.2. Determinação da concentração da metalotioneína nas brânquias

A concentração de metalotioneína nas amostras de brânquias nos grupos controle e exposto ao MPAS foi realizada avaliando o conteúdo de resíduos de grupos sulfidril (SH) utilizando o reagente de Ellman (DTNB) de acordo com o método descrito por Viarengo et al. (1997) com pequenas modificações. Em resumo, as amostras foram homogeneizadas em tampão tris-HCl na proporção de 0,1 g de tecido para 0,5 mL de tampão e, em seguida, foram centrifugadas. Após uma última centrifugação, reservou-se o sobrenadante ao qual foi adicionado o reagente de Ellman e, em seguida, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 412 nm. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada de acordo com Bradford (1976), com leitura em espectrofotômetro a 595 nm, para expressão dos resultados por concentração de proteína.

Uma vez que as metalotioneínas são caracterizadas por alto conteúdo de cisteínas (30 %), as absorvâncias obtidas das amostras foram comparadas a uma curva-padrão de GSH. A concentração de metalotioneínas foi expressa em ng de MT/mg de proteína.

3.3.7. Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como médias \pm erro padrão da média. Todos os dados foram testados para normalidade (Shapiro Wilks). Os dados referentes à bioacumulação resultaram como paramétricos em contraste aos dados da histologia e MT que resultaram como não paramétricos. A análise de variância por Anova e pós-teste Tukey foi aplicada para dados paramétricos e determinadas as diferenças entre dias de exposição em um mesmo grupo. O teste T-student foi utilizado para determinação de diferença entre as amostras do grupo exposto quando comparados ao controle para um mesmo dia. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste Dunn foi utilizado para os dados não paramétricos para determinar diferença entre amostras do grupo exposto comparados ao controle para um mesmo dia.

A correlação de Spearman foi calculada relacionando as concentrações de cada metal nas amostras de filé, vísceras, organismo total e água, entre si e com os resultados obtidos nos parâmetros biológicos (IAH e MT). Apenas os valores significativos foram reportados.

As análises estatísticas foram realizadas com o software Infostat (Di Rienzo, et al 2018) e diferenças significativas foram consideradas em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros de qualidade água e dados biométricos dos animais

A massa média dos espécimes dos grupos controle e exposto foram $1,443 \pm 0,657$ g e $1,212 \pm 0,612$ g e os comprimentos médios foram $4,486 \pm 0,706$ e $4,179 \pm 0,702$, respectivamente.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros da qualidade da água dos aquários durante os experimentos. Comparando os valores encontrados, não houve diferença significativa entre os grupos controle e exposto nos parâmetros de temperatura, oxigênio dissolvido e pH. Em contraste, a condutividade do grupo exposto ao MPAS foi significativamente maior que o controle.

TABELA 4: Parâmetros de qualidade da água dos experimentos: grupo Controle e Expostos, expressos em média + desvio padrão. (*) indica diferença significativa comparado ao Controle.

Parâmetros	Controle	Exposto (1 g MPAS.L ⁻¹)
Temperatura (°C)	$26,6 \pm 0,6$	$26,2 \pm 0,9$
Oxigênio dissolvido (%)	$99 \pm 2,1$	$99,6 \pm 1,3$
Condutividade (µs/cm)	$58,8 \pm 7,2$	$82,4 \pm 10,8$ *
pH	$7,4 \pm 0,17$	$7,6 \pm 0,13$

4.2. Concentração de Metais no Material Particulado Atmosférico Sedimentável

O lote de MPAS utilizado no presente estudo foi coletado durante a estação seca (Abril a Agosto) de 2018. A análise multielementar de amostra deste lote mostrou que o MPAS era

constituído por diferentes metais, dos quais apenas o Tântalo (Ta) foi identificado, mas não quantificado (Tabela 5).

TABELA 5: Concentração de metais ($\mu\text{g.g}^{-1}$) presentes no MPAS. Concentrações de metais presentes no lote de MPAS coletado na estação seca (Abril a Agosto) de 2018. Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) são dados para cada metal.

Elemento	Concentração $\mu\text{g.g}^{-1}$	LOD	LOQ
B	20,0295	0,515232	1,430708
Al	5522,8039	10,50303	12,82689
Ti	1108,944	0,05671	0,188844
V	28,2162	0,03774	0,125674
Cr	34,5293	0,05977	0,199034
Mn	554,9903	0,5111	1,701963
Fe-56	69199,0411	0,17902	0,522849
Fe-57	67327,7702	6,556341	13,33243
Ni	14,7430	0,003937	0,011502
Cu	84,79207	0,05859	0,195105
Zn	274,8618	0,1118	0,322114
As	2,9307	0,2341	0,779553
Se	2,250798	0,522112	0,796678
Rb	4,924922	0,037802	0,071287
Sr	56,63187	0,015782	0,043615
Y	17,40134	0,00091	0,002651
Zr	43,78726	0,120881	0,301769
Nb	2,556451	0,018256	0,05248
Ag	0,1030	0,001191	0,003478
Cd	1,473974	0,036299	0,101926
Sn	15,21546	0,086621	0,241916
Ba	1,32738	0,008855	0,010498
La	29,90025	0,02032	0,067666
Ce	65,49402	0,020447	0,059735
Ta	0,0000	0,017799	0,050748
W	1,6338	0,004635	0,013073
Hg 201	0,3229	0,37198	0,986697
Hg 202	0,3460	0,062704	0,099428
Pb	50,85892	0,047809	0,137816
Bi	1,0791	0,026763	0,074658

4.3. Concentração de metais na água nos grupos controle e expostos ao MPAS

Para análise do efeito na biota e do padrão de bioacumulação foram selecionados os seguintes metais: Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb, por apresentarem concentrações acima de 100 µg/g (Tabela 6) e terem limites estabelecidos pelo CONAMA (CONAMA 357/05, 2005). Os dados referentes ao ferro do presente trabalho se referem às concentrações determinadas para o Fe-56, desconsiderando-se então os do Fe-57.

A concentração de MPAS nominal adicionada ao grupo expostos estão descritas na Tabela 6, juntamente com a concentração de metais na água do grupo Controle. No geral, a concentração determinada para os metais foi em torno de 1 a 10% da concentração nominal ao longo da exposição, com exceção do Fe (<1%) e o Cu (7 a 22 %).

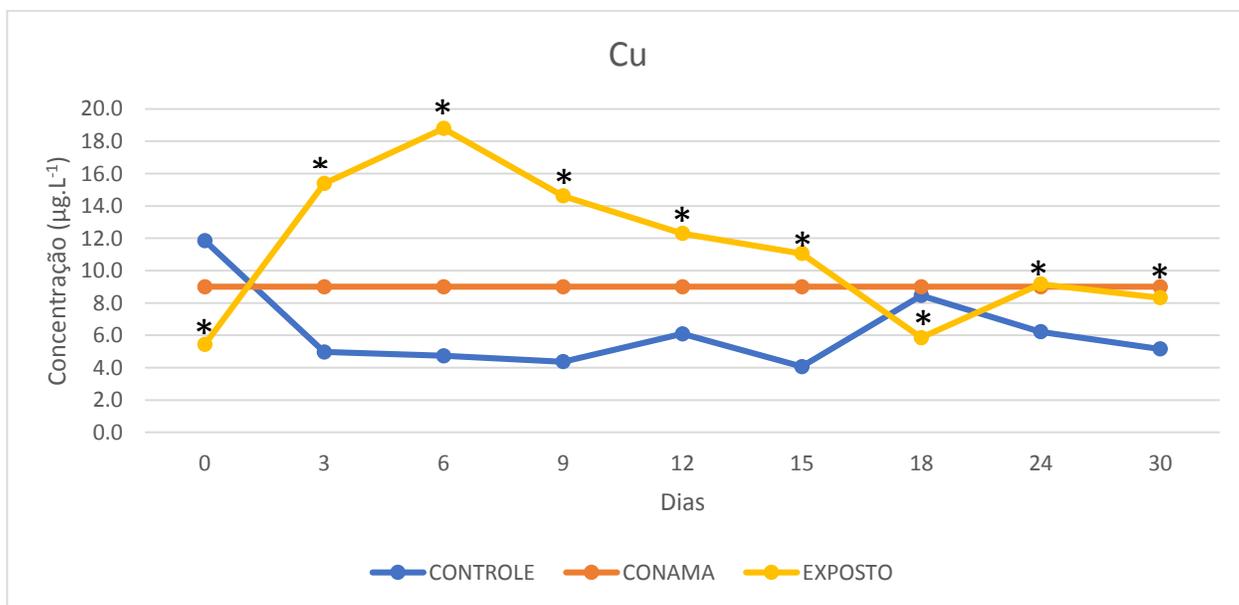
TABELA 6: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dos metais Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb na água dos grupos Controle e Exposto ao pó preto durante o experimento. A concentração dos metais no grupo Controle não apresentou diferenças significativas estão apresentadas como média e erro padrão. No grupo Exposto são dadas a concentração nominal e concentrações reais dos metais na água.

	Cu	Fe	Al	Zn	Mn	Pb
Controle	6,21 \pm 0,74	<LOD	<LOQ	9,59 \pm 0,6	<LOD	5,71 \pm 2,84
	Exposto					
[Nominal]	84,79	69199,04	5522,80	274,86	554,99	50,86
	[Real]					
D0	5,43 \pm 0,003	<LOD	<LOQ	4,795 \pm 0,278	<LOD	<LOQ
D3	15,39 \pm 0,17 (18,2%)	511,05 \pm 5,82 (0,7%)	553,99 \pm 3,26 (10%)	29,32 \pm 0,18 (10,7%)	37,58 \pm 0,17 (6,8%)	3,23 \pm 0,05 (6,4%)
D6	18,79 \pm 0,084 (22,2%)	627,45 \pm 5,72 (0,9%)	645,83 \pm 1,12 (11,7%)	35,73 \pm 0,1 (13%)	44,12 \pm 0,31 (7,9%)	14,79 \pm 0,18 (29,1%)
D9	14,62 \pm 0,08 (17,2%)	404,68 \pm 1,35 (0,6%)	481,874 \pm 1,68(8,7%)	22,54 \pm 0,12 (8,2%)	22,64 \pm 0,14 (4,1%)	2,14 \pm 0,03 (4,2%)
D12	12,3 \pm 0,12 (14,5%)	412,1 \pm 2,73 (0,6%)	258,81 \pm 3,74 (4,7%)	20,31 \pm 0,03 (7,4%)	22,05 \pm 0,11 (4%)	4,75 \pm 0,02 (9,3%)
D15	11,06 \pm 0,05 (13%)	155,54 \pm 0,12 (0,2%)	267,9 \pm 1,05 (4,9%)	18,45 \pm 0,14 (6,7%)	10,34 \pm 0,08 (1,9%)	0,98 \pm 0,004 (1,9%)
D18	5,85 \pm 0,05 (6,9%)	<LOD	90,23 \pm 0,59 (1,6%)	9,46 \pm 0,1 (3,4%)	<LOD	<LOD
D24	9,17 \pm 0,02 (10,8%)	54,52 \pm 0,47 (0,1%)	167,95 \pm 0,37 (3%)	8,33 \pm 0,15 (3%)	<LOQ	2,26 \pm 0,01 (4,4%)
D30	8,33 \pm 0,13 (9,8%)	15,64 \pm 1,06 (0,02%)	166,96 \pm 1,75 (3%)	5,22 \pm 0,39 (1,9%)	<LOD	<LOD

As concentrações de metais nas amostras de água dos grupos: controle e exposto foram comparados aos limites estabelecidos pelo Conama para águas dulcícolas de classe 2 (CONAMA 357/05, 2005) destinadas à proteção das comunidades aquáticas; ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à recreação de contato primário; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e à aquicultura e à atividade de pesca (Fig 4 ,5 ,6 ,7 e 8).

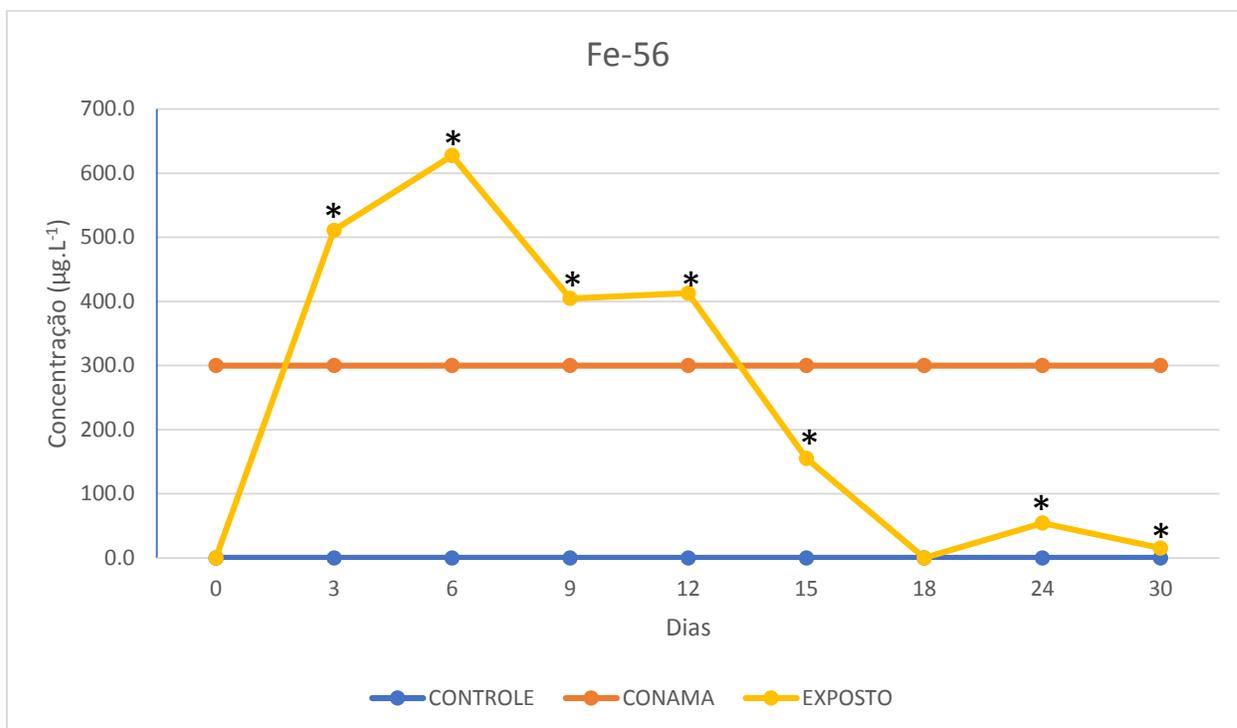
A variação de Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb nas amostras de água nos grupos controle e exposto em relação ao limite estabelecido pelo Conama (CONAMA 357/05, 2005) para águas dulcícolas, classe 2 se encontram nas Figuras 3, 4, 5, 6, 7. e 8, respectivamente.

FIGURA 3: Concentração de Cu ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos. CONAMA: O limite estabelecido pela resolução Conama (CONAMA 357/05, 2005) para água dulcícola, classe 2. CONTROLE: água grupo controle; EXPOSTO: água grupo expostos. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



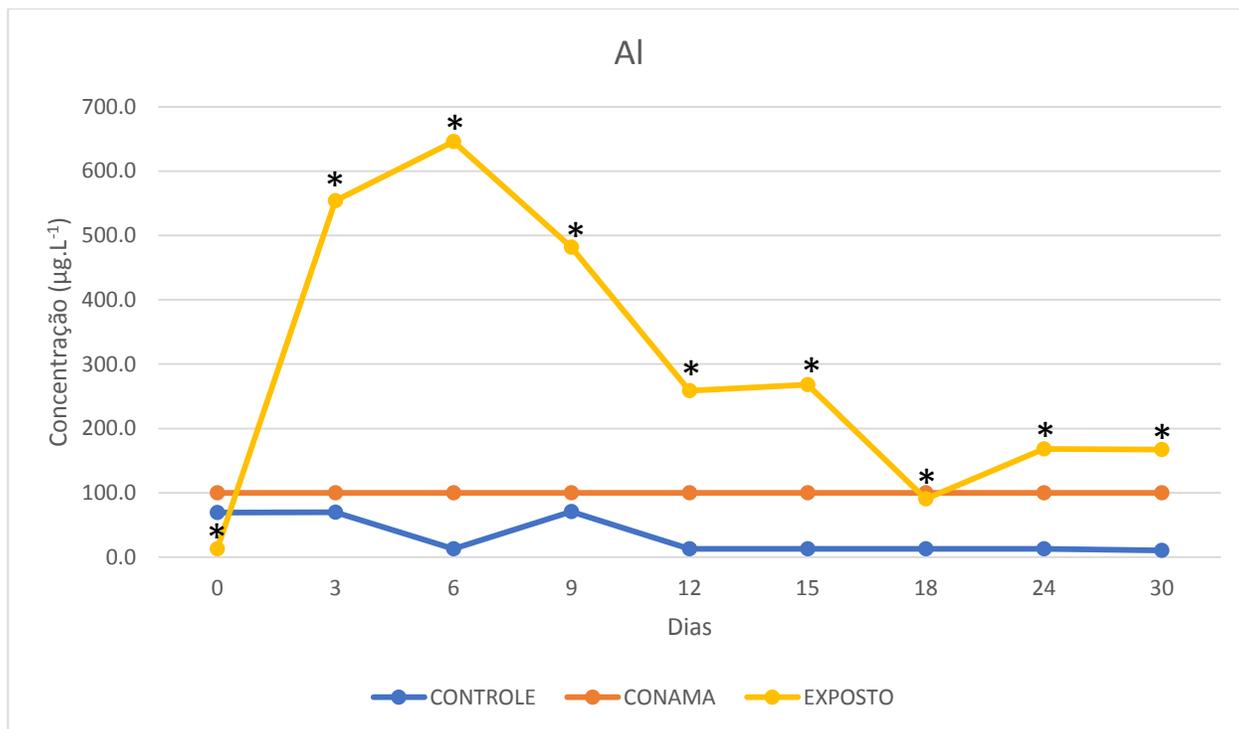
A concentração de Cu determinada no grupo exposto ao MPAS foi superior aos limites estabelecidos pelo CONAMA (CONAMA 357/05, 2005) para águas dulcícolas ($9 \mu\text{g/L}$) do dia 3 ao dia 15 e dia 24.

FIGURA 4: Concentração de Fe ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos. CONAMA: O limite estabelecido pela resolução Conama (CONAMA 357/05, 2005) para água dulcícola, classe 2. CONTROLE: água grupo controle; EXPOSTO: água grupo expostos. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



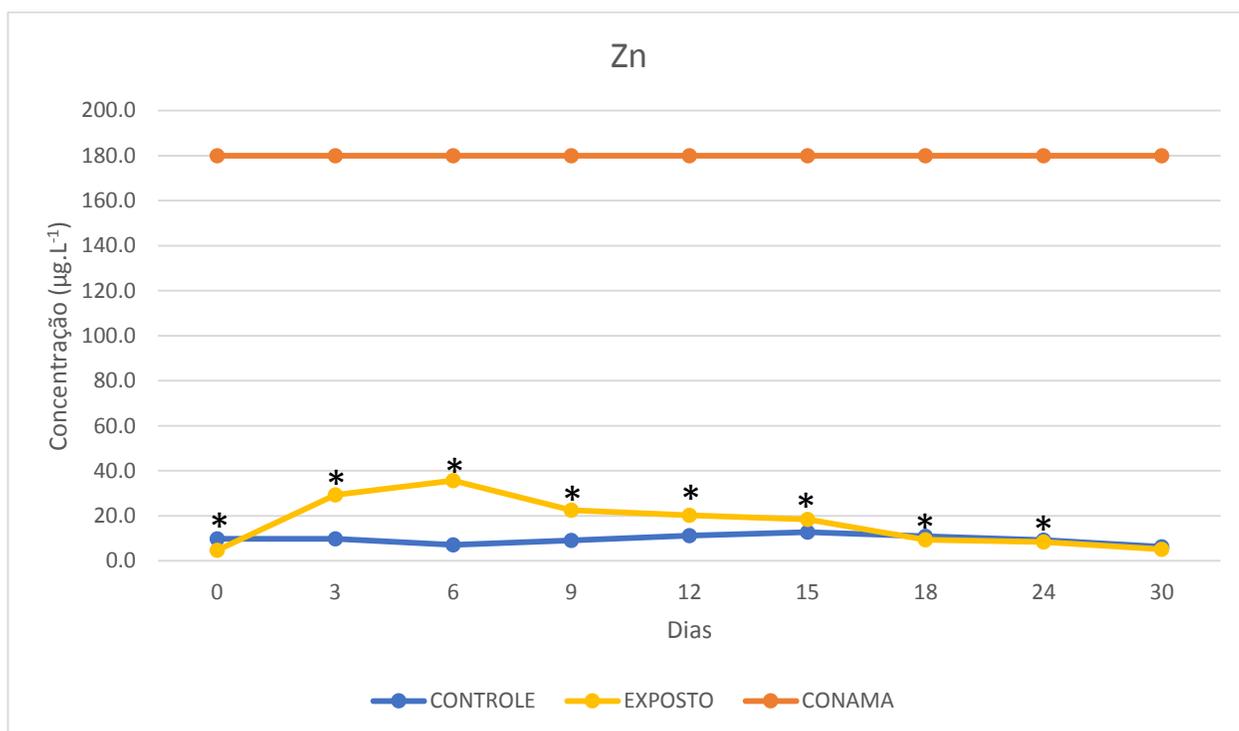
A concentração de Fe determinada no grupo exposto ao MPAS foi superior aos limites estabelecidos pelo CONAMA (CONAMA 357/05, 2005) para águas dulcícolas ($300 \mu\text{g/L}$) do dia 3 ao dia 12.

FIGURA 5: Concentração de Al ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos. CONAMA: O limite estabelecido pela resolução Conama (CONAMA 357/05, 2005) para água dulcícola, classe 2. CONTROLE: água grupo controle; EXPOSTO: água grupo expostos. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



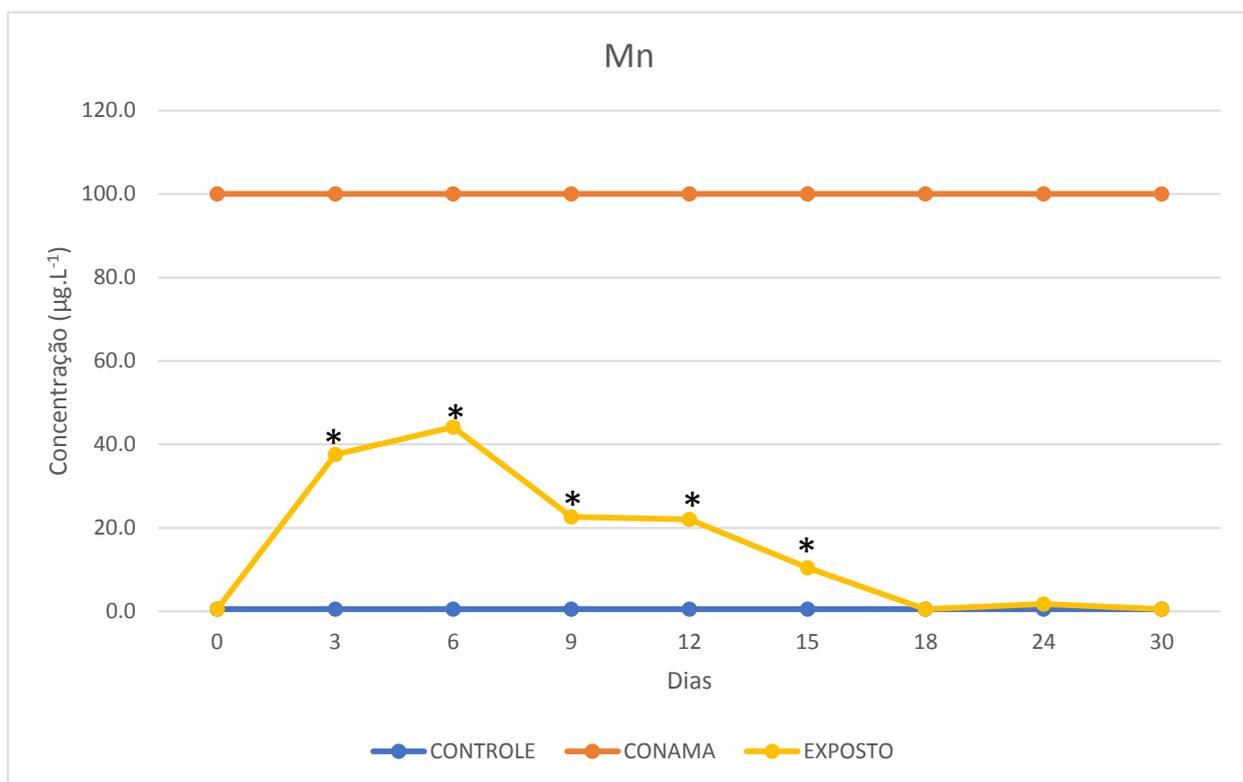
A concentração de Al determinada no grupo exposto ao MPAS foi superior aos limites estabelecidos pelo CONAMA (CONAMA 357/05, 2005) para águas dulcícolas (100 $\mu\text{g}/\text{L}$) em todos os dias com exceção do dia 18.

FIGURA 6: Concentração de Zn ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos. CONAMA: O limite estabelecido pela resolução Conama (CONAMA 357/05, 2005) para água dulcícola, classe 2. CONTROLE: água grupo controle; EXPOSTO: água grupo expostos. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



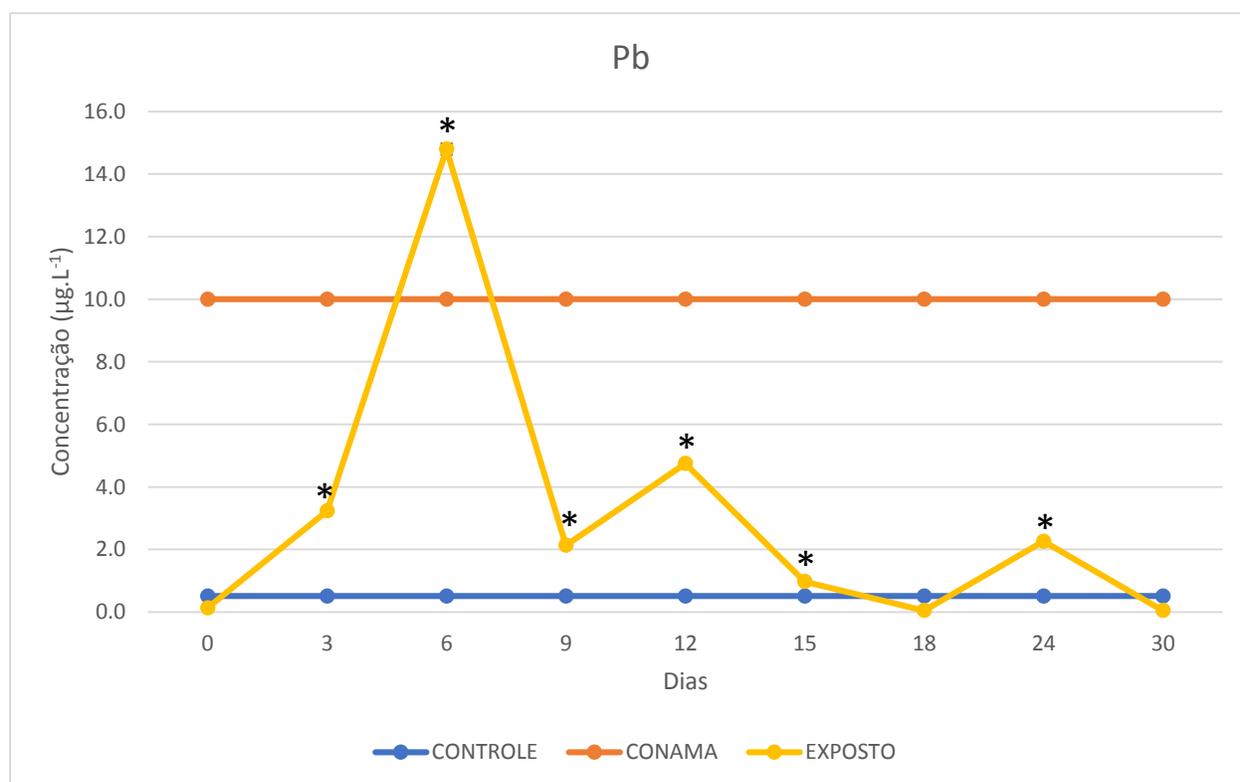
A concentração de Zn determinada nos aquários do grupo exposto foi inferior aos limites estabelecidos pelo Conama em todos os dias para águas dulcícolas (CONAMA 357/05, 2005) (180 $\mu\text{g/L}$).

FIGURA 7: Concentração de Mn ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos. CONAMA: O limite estabelecido pela resolução Conama (CONAMA 357/05, 2005) para água dulcícola, classe 2. CONTROLE: água grupo controle; EXPOSTO: água grupo expostos. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



A concentração de Mn determinada nos aquários do grupo exposto não ultrapassou os limites estabelecidos pelo Conama para água águas dulcícolas (CONAMA 357/05, 2005) ($100 \mu\text{g}/\text{L}$).

FIGURA 8: Concentração de Pb ($\mu\text{g.L}^{-1}$) nas amostras de água ao longo dos experimentos. CONAMA: O limite estabelecido pela resolução Conama (CONAMA 357/05, 2005) para água dulcícola, classe 2. CONTROLE: água grupo controle; EXPOSTO: água grupo expostos. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



A concentração de Pb determinada nos aquários não ultrapassou o limite estabelecidos pelo Conama (CONAMA 357/05, 2005) para água dulcícolas (10 $\mu\text{g/L}$) com exceção do dia 6.

4.4. Concentração ($\mu\text{g/g}$) dos metais Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb nas vísceras e filé de *O. niloticus*.

4.4.1. Cobre

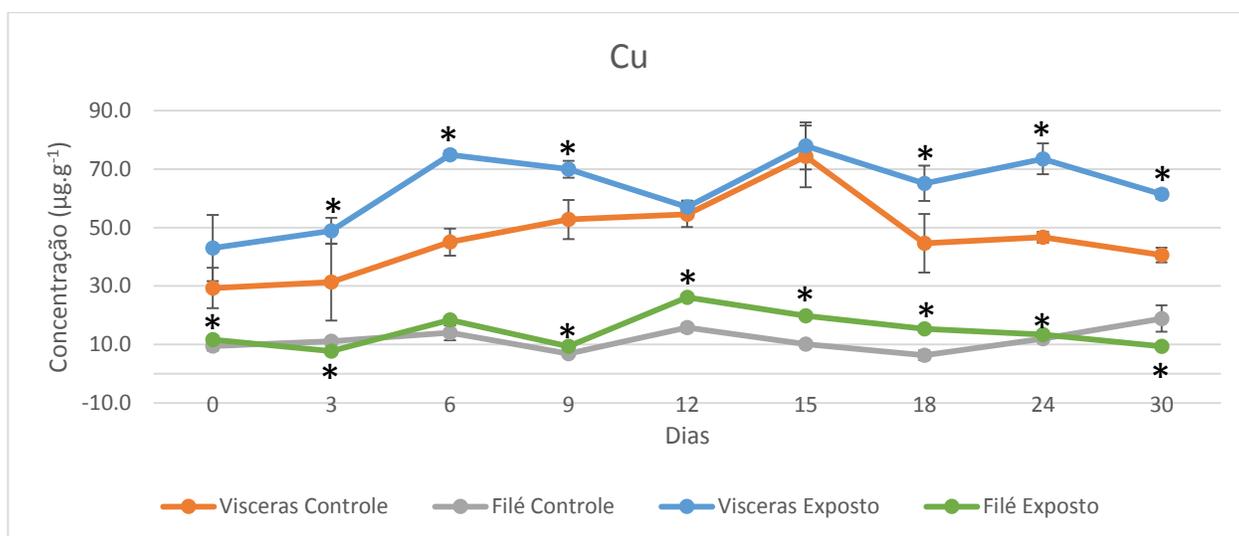
A concentração de Cu determinada nas amostras de vísceras e filé se encontra na Tabela 7. O padrão de bioacumulação do Cu nas amostras de vísceras e filé no grupo controle e exposto é apresentado na Figura 9.

TABELA 7: Concentração de Cu na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição expressos como média + erro padrão. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna) ($P > 0,05$); (*) = diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

Dia	CH	EH	CV	EV	CF	EF
0	11,858 \pm 0,039 G	5,43 \pm 0,003 A*	29,297 \pm 6,912 AB	43,01 \pm 11,311 A	9,44 \pm 1,514 AB	11,638 \pm 1,662 AB*
3	4,969 \pm 0,05 CD	15,392 \pm 0,172 F*	31,36 \pm 13,168 A	48,858 \pm 4,424 AB*	11,099 \pm 0,556 AB	7,768 \pm 0,513 A*
6	4,731 \pm 0,075 C	18,791 \pm 0,084 G*	45,059 \pm 4,62 AB	74,873 \pm 1,451 C*	14,008 \pm 2,602 AB	18,436 \pm 4,217 ABC
9	4,367 \pm 0,032 B	14,622 \pm 0,076 E*	52,776 \pm 6,682 AB	69,949 \pm 2,915 BC*	6,823 \pm 0,118 A	9,387 \pm 0,519 AB*
12	6,096 \pm 0,096 E	12,3 \pm 0,123 E*	54,543 \pm 4,349 AB	57,08 \pm 2,986 ABC	15,74 \pm 2,248 AB	26,117 \pm 3,636 C*
15	4,065 \pm 0,035 A	11,062 \pm 0,053 D*	74,373 \pm 10,539 B	77,947 \pm 8,068 C	10,166 \pm 1,207 AB	19,81 \pm 4,432 BC*
18	8,467 \pm 0,092 F	5,851 \pm 0,053 A*	44,603 \pm 9,989 AB	65,122 \pm 6,039 ABC*	6,315 \pm 1,639 A	15,309 \pm 1,313 ABC*
24	6,217 \pm 0,018 E	9,167 \pm 0,022 C*	46,716 \pm 1,862 AB	73,504 \pm 5,297 BC*	12,034 \pm 1,046 AB	13,437 \pm 1,271 AB*
30	5,152 \pm 0,054 D	8,327 \pm 0,131 B*	40,596 \pm 2,503 A	61,415 \pm 1,565 ABC*	18,875 \pm 4,55 B	9,424 \pm 0,989 AB*

CH: água grupo controle; EH: água grupo exposto ao MPAS; CV: vísceras controle; EV: vísceras grupo exposto ao MPAS; CF: filé controle; EF: filé exposto ao MPAS.

FIGURA 9: Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de Cu nas vísceras e filé de *O. niloticus* ao longo de 30 dias. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



4.4.2. Ferro

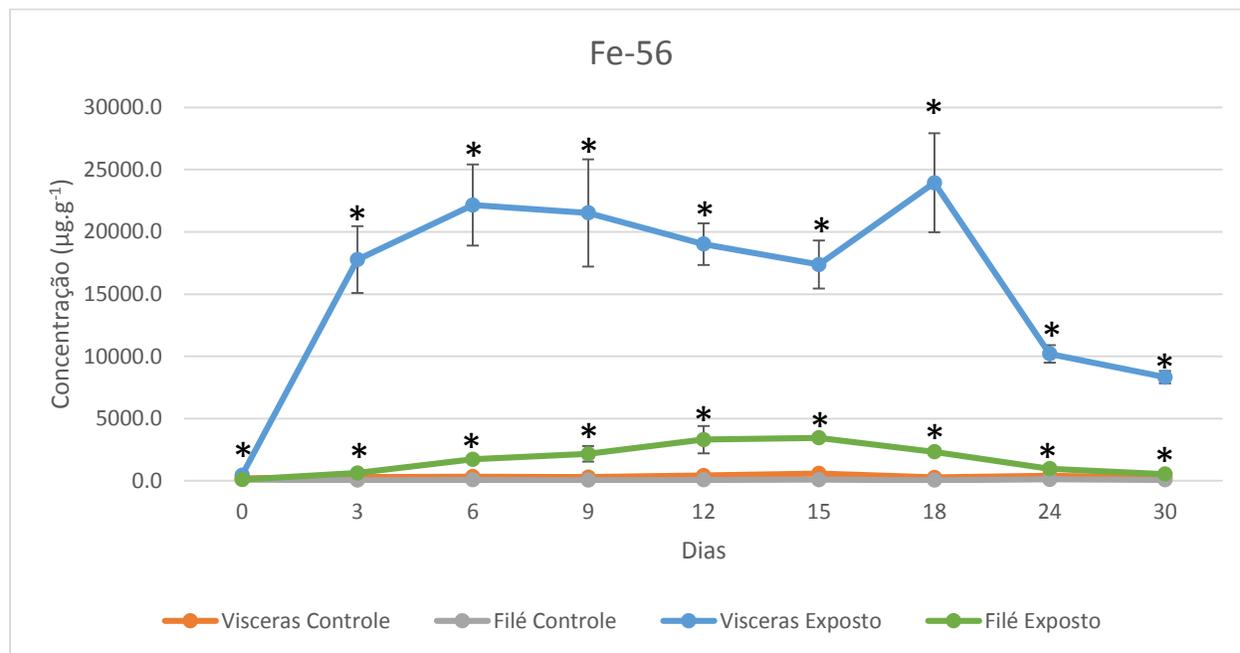
A concentração de Fe determinada nas amostras se encontra representada na Tabela 8. O padrão de bioacumulação do Fe nas amostras de vísceras e filé nos grupos controle e exposto é apresentado na Figura 10.

TABELA 8: Concentração de Fe na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição expressos como média + erro padrão. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna) ($p > 0,05$); (*) = diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

Dia	CH	EH	CV	EV	CF	EF
0	<LOD	<LOD	201,158 ± 41,032 A	447,404 ± 108,631 A*	108,942 ± 23,074 B	107,857 ± 5,27 A
3	<LOD	511,049 ± 5,821 F*	298,033 ± 133,076 A	17770,163 ± 2678,524 BCD *	53,699 ± 4,963 AB	634,913 ± 135,659 ABC*
6	<LOD	627,445 ± 5,72 G*	328,648 ± 45,067 A	22156,717 ± 3256,415 D*	76,568 ± 9,713 AB	1721,595 ± 239,165 BCD*
9	<LOD	404,684 ± 1,351 E *	296,873 ± 9,112 A	21525,963 ± 4310,721 CD*	49,973 ± 2,708 A	2162,342 ± 630,683 BCD*
12	<LOD	155,535 ± 0,122 E*	584,546 ± 18,342 AB	17372,412 ± 1928,593 BCD*	97,884 ± 4,464 AB	3454,549 ± 285,085 D*
15	<LOD	155,535 ± 0,122 D*	584,546 ± 18,342 B	17372,412 ± 1928,593 BCD *	97,884 ± 4,464 AB	3454,549 ± 285,085 D *
18	<LOD	<LOD	268,986 ± 55,586 A	23947,79 ± 3980,901 D *	48,543 ± 10,819 A	2334,872 ± 14,708 CD*
24	<LOD	54,523 ± 0,416 C*	413,027 ± 13,547 A	10198,871 ± 702,331 ABC *	118,165 ± 17,457 B	976,823 ± 167,924 ABC*
30	<LOD	15,642 ± 1,061 B*	247,923 ± 21,934 AB	8324,181 ± 495,162 AB*	78,167 ± 8,882 AB	535,302 ± 78,847 AB*

CH: água grupo controle; EH: água grupo exposto ao MPAS; CV: vísceras controle; EV: vísceras grupo exposto ao MPAS; CF: filé controle; EF: filé exposto ao MPAS.

FIGURA 10: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de Fe nas vísceras e filé de *O. niloticus* ao longo de 30 dias. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



4.4.3. Alumínio

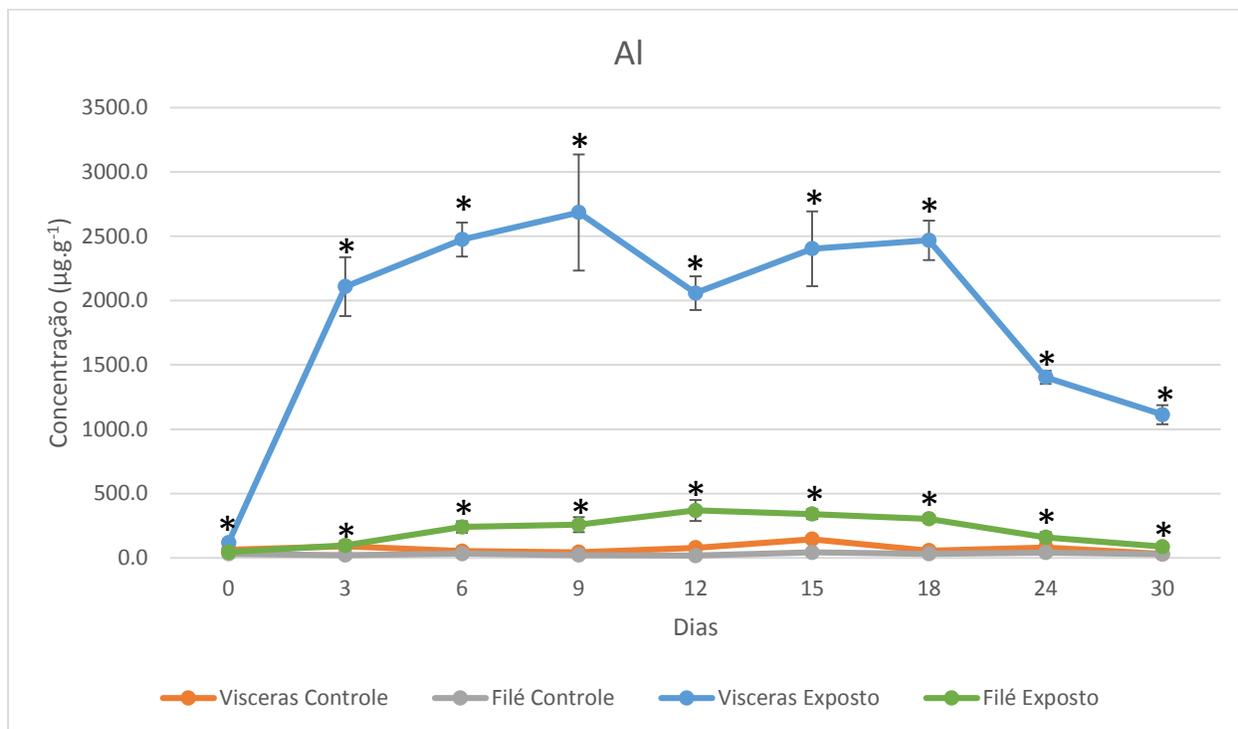
A concentração de Al determinada para as diversas amostras se encontra representada na Tabela 9. O padrão de bioacumulação do Al nas amostras de vísceras e filé no grupo controle e exposto é apresentado ilustrados na Figura 11.

TABELA 9: Concentração de Al na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição expressos como média + erro padrão. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p > 0,05$); (*) = diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

Dia	CH	EH	CV	EV	CF	EF
0	69,011 ± 0,356 C	<LOQ *	63,301 ± 15,031 A	119,396 ± 29,345 * A	31,169 ± 4,893 AB	45,579 ± 1,73 A *
3	69,734 ± 0,254 C	553,986 ± 3,235 F*	91,485 ± 39,454 AB	2108,635 ± 228,106 BCD *	22,178 ± 4,098 AB	97,431 ± 16,471 AB *
6	<LOQ	645,829 ± 1,116 G*	52,319 ± 14,831 A	2474,802 ± 132,048 D *	32,381 ± 3,815 AB	241,061 ± 44,45 BC *
9	70,67 ± 0,147 D	481,874 ± 1,676 E*	43,699 ± 2,595 A	2684,862 ± 450,57 D *	22,061 ± 1,46 AB	258,429 ± 59,217 BCD*
12	<LOQ	267,896 ± 1,05 D *	78,954 ± 7,81 AB	2402,665 ± 289,705 BCD*	42,557 ± 3,349 A	340,521 ± 38,562 D *
15	<LOQ	267,896 ± 1,05 D*	145,142 ± 17,363 B	2402,665 ± 289,705 CD*	42,557 ± 3,349 B	340,521 ± 38,562 CD *
18	<LOQ	90,226 ± 0,587 B*	56,697 ± 9,737 A	2468,265 ± 153,063 D*	32,061 ± 8,888 AB	303,157 ± 29,182 CD*
24	<LOQ	167,948 ± 0,348 C*	80,728 ± 1,613 AB	1403,784 ± 50,442 BC *	41,839 ± 3,628 B	160,27 ± 39,523 AC*
30	<LOD	166,963 ± 1,753 C *	29,972 ± 4,823 A	1113,479 ± 73,749 AB *	28,56 ± 4,861 AB	87,35 ± 12,315 AB*

CH: água grupo controle; EH: água grupo exposto ao MPAS; CV: vísceras controle; EV: vísceras grupo exposto ao MPAS; CF: filé controle; EF: filé exposto ao MPAS.

FIGURA 11: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de Al nas vísceras e filé de *O. niloticus* ao longo de 30 dias. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



4.4.4. Zinco

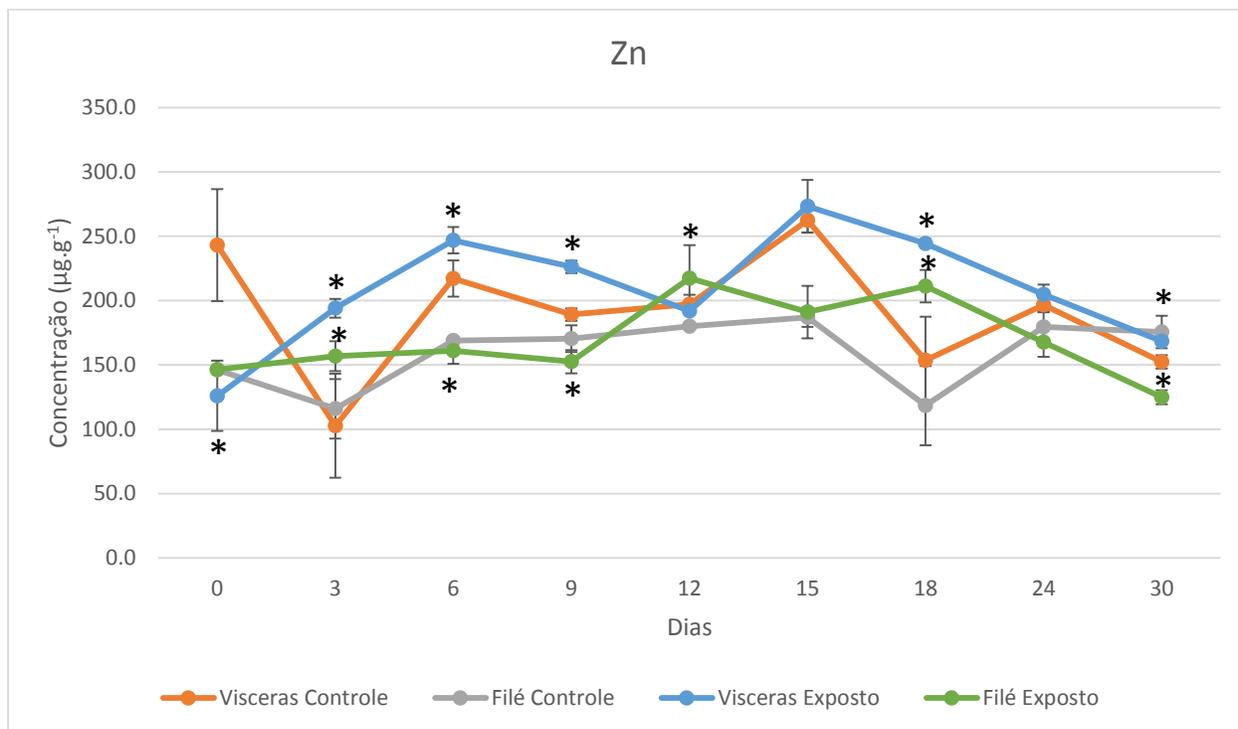
A concentração de Zn determinada para as diversas amostras se encontra representada na Tabela 10. O padrão de bioacumulação do Zn nas amostras de vísceras e filé no grupo exposto e controle é apresentado ilustrados na Figura 12.

TABELA 10: Concentração de Zn na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição expressos como média + erro padrão. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p > 0,05$); (*) = diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

Dia	CH	EH	CV	EV	CF	EF
0	9,816 ± 0,108 C D	4,795 ± 0,278 A *	243,049 ± 43,593 B C	126,783 ± 27,335 A *	146,232 ± 3,25 A B	146,359 ± 1,716 A B
3	9,816 ± 0,216 C D	29,322 ± 0,18 G *	102,685 ± 40,44 A	194,015 ± 7,226 B C *	115,867 ± 23,142 A	156,782 ± 11,521 A B C *
6	7,12 ± 0,05 A B	35,732 ± 0,095 H *	217,034 ± 14,086 B C	246,896 ± 10,26 C D *	168,916 ± 2,35 A B	161,029 ± 10,29 A B C
9	9,052 ± 0,082 B C	22,538 ± 0,124 F *	189,108 ± 4,886 A B C	226,255 ± 4,801 C D *	170,352 ± 10,443 A B	152,565 ± 9,027 A B
12	11,291 ± 0,407 D E	20,308 ± 0,033 E *	197,169 ± 7,365 A B C	191,927 ± 8,449 B C	180,036 ± 1,988 A B	217,493 ± 17,286 D *
15	12,776 ± 0,092 E	18,446 ± 0,139 D *	262,397 ± 9,767 C	273,394 ± 20,402 D	187,032 ± 7,52 B	191,062 ± 20,486 B C D
18	10,905 ± 0,284 C D E	9,462 ± 0,096 A *	153,613 ± 33,762 A B	244,429 ± 3,408 C D *	118,433 ± 30,8 A	211,133 ± 12,645 C D *
24	9,307 ± 0,278 C D	8,334 ± 0,15 C	196,591 ± 5,764 A B C	204,815 ± 7,616 B C	179,554 ± 11,91 A B	167,721 ± 11,415 A B C D
30	6,225 ± 0,041 A	5,221 ± 0,386 B	152,343 ± 5,126 A B	168,532 ± 2,834 A B *	175,591 ± 12,59 A B	124,956 ± 5,434 A *

CH: água grupo controle; EH: água grupo exposto ao MPAS; CV: vísceras controle; EV: vísceras grupo exposto ao MPAS; CF: filé controle; EF: filé exposto ao MPAS.

FIGURA 12: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de Zn nas vísceras e filé de *O. niloticus* ao longo de 30 dias. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



4.4.5. Manganês

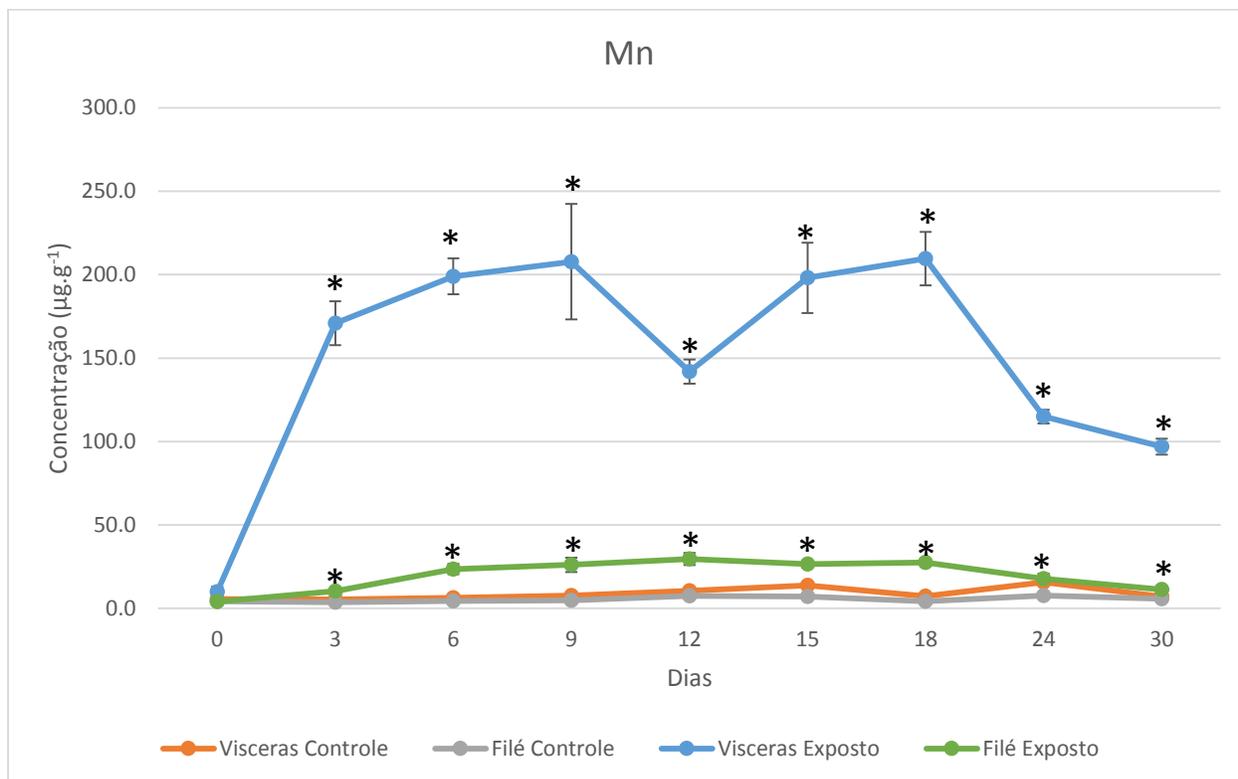
A concentração de Mn determinada para as diversas amostras se encontra representada na Tabela 11. O padrão de bioacumulação do Mn nas amostras de vísceras e filé no grupo controle é apresentado se encontram ilustrados na Figura 13.

TABELA 11: Concentração de Mn na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição expressos como média + erro padrão. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p > 0,05$); (*) = diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

Dia	CH	EH	CV	EV	CF	EF
0	<LOD	<LOD	5,617 ± 0,848 A	10,009 ± 2,966 A	4,289 ± 0,168 AB	3,999 ± 0,043 A
3	<LOD	37,579 ± 0,168 C*	5,437 ± 2,244 A	170,852 ± 13,208 BC*	3,741 ± 0,586 A	10,401 ± 1,607 AB*
6	<LOD	44,12 ± 0,31 D*	6,284 ± 0,734 A	198,963 ± 10,764 C*	4,505 ± 0,329 AB	23,54 ± 3,173 CD*
9	<LOD	22,642 ± 0,135 B*	7,703 ± 0,503 A	207,756 ± 34,648 C*	4,878 ± 0,39 ABC	26,093 ± 4,209 D*
12	<LOD	22,047 ± 0,111 B*	10,613 ± 0,433 AB	141,907 ± 18,63 BC*	7,573 ± 0,407 C	29,587 ± 4,786 D*
15	<LOD	10,397 ± 0,076 A*	13,801 ± 1,858 B	198,101 ± 21,047 C*	7,157 ± 1,102 BC	26,579 ± 2,115 D*
18	<LOD	<LOD	7,3 ± 1,496 A	209,629 ± 16,029 C*	4,214 ± 1,017 AB	27,577 ± 2,232 D*
24	<LOD	<LOQ	15,653 ± 0,781 B	114,929 ± 4,066 B*	7,742 ± 0,356 C	17,873 ± 2,949 BCD*
30	<LOD	<LOD	7,026 ± 1,34 A	96,9 ± 4,853 B*	5,736 ± 0,855 ABC	11,27 ± 0,217 ABC*

CH: água grupo controle; EH: água grupo exposto ao MPAS; CV: vísceras controle; EV: vísceras grupo exposto ao MPAS; CF: filé controle; EF: filé exposto ao MPAS.

FIGURA 13: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de Zn nas vísceras e filé de *O. niloticus* ao longo de 30 dias. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



4.4.6. Chumbo

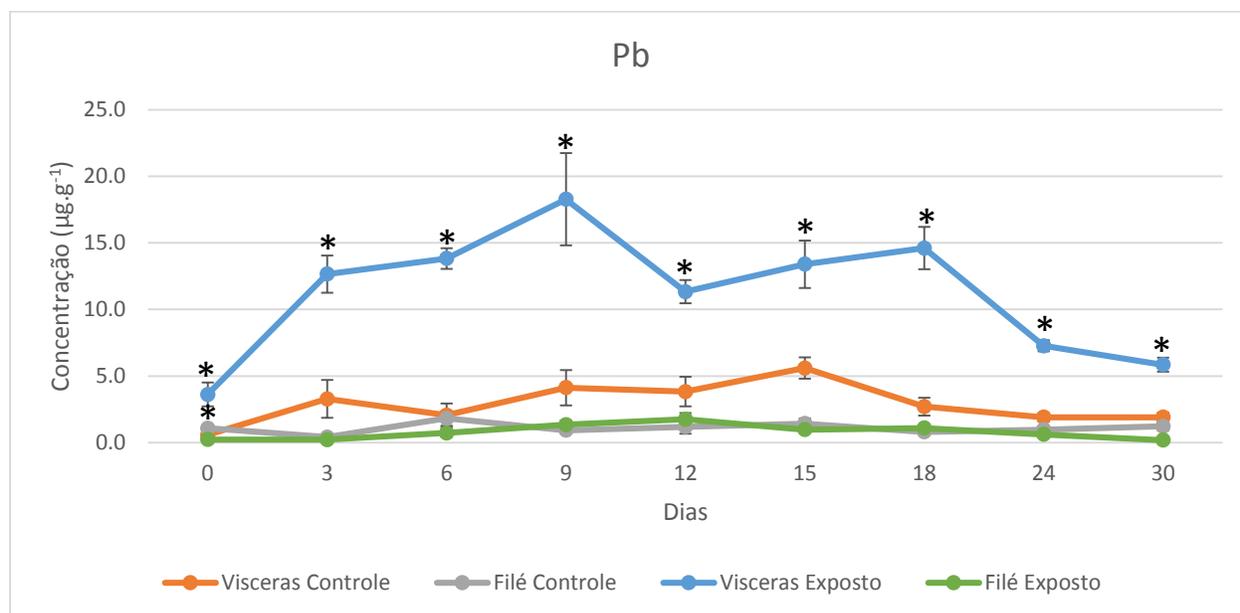
A concentração de Pb determinada para as diversas amostras se encontra representada na Tabela 12. O padrão de bioacumulação do Pb nas amostras de vísceras e filé no grupo controle e exposto é apresentado ilustrados na Figura 14.

TABELA 12: Concentração de Pb na água ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e nas vísceras (V) e filé (F) ($\mu\text{g.g}^{-1}$) de *Oreochromis niloticus* dos grupos controle (C) e expostos (E) ao pó preto durante os 30 dias de exposição expressos como média + erro padrão. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p > 0,05$); (*) = diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

Dia	CH	EH	CV	EV	CF	EF
0	1,107 ± 0,019 B	<LOQ	0,788 ± 0,022 A	5,345 ± 0,215 A*	1,542 ± 0,055 A	0,226 ± 0,023 A*
3	0,887 ± 0,001 A	3,232 ± 0,045 C*	3,28 ± 1,414 AB	12,653 ± 1,4 BCD*	0,407 ± 0,056 A	<LOQ
6	<LOQ	14,794 ± 0,183 E*	3,01 ± 0,733 AB	13,823 ± 0,772 CD*	2,652 ± 0,364 A	<LOQ
9	6,047 ± 0,063 D	2,136 ± 0,028 B*	4,12 ± 1,328 AB	18,269 ± 3,466 D*	1,31 ± 0,11 A	1,939 ± 0,144 BC
12	19,087 ± 0,021 B	4,749 ± 0,015 D*	3,83 ± 1,112 AB	11,332 ± 1,629 BCD*	1,182 ± 0,415 A	1,749 ± 0,414 C
15	<LOD	0,978 ± 0,004 A*	5,592 ± 0,8 B	13,394 ± 1,782 CD*	1,418 ± 0,384 A	0,972 ± 0,058 ABC
18	1,456 ± 0,019 C	<LOD	2,703 ± 0,671 AB	14,609 ± 1,597 CD*	0,801 ± 0,15 A	1,089 ± 0,223 ABC
24	<LOQ	2,26 ± 0,01 B*	1,898 ± 0,315 AB	7,266 ± 0,417 ABC*	0,974 ± 0,178 A	0,851 ± 0,191 AB
30	<LOD	<LOD	1,902 ± 0,346 AB	5,849 ± 0,52 AB*	1,758 ± 0,172 A	0,193 ± 0,002 A*

CH: água grupo controle; EH: água grupo exposto ao MPAS; CV: vísceras controle; EV: vísceras grupo exposto ao MPAS; CF: filé controle; EF: filé exposto ao MPAS.

FIGURA 14: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) de Pb nas vísceras e filé de *O. niloticus* ao longo de 30 dias. (*) = diferença significativa em relação ao controle.



Para todos os metais avaliados (Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb) houve um aumento de concentração nas vísceras e no filé do grupo exposto ao MPAS em relação ao grupo controle e ao longo do tempo. O Cu aumentou nas vísceras nos dias 6, 9 e 15 de exposição ao MPAS e nos dias 12 e 15 no filé quando comparados ao dia 0. Para o Fe, as concentrações dos dias 3 ao 18 das vísceras e 6 a 18 do filé apresentaram aumento quando comparados ao dia 0. Para o Al verificou-se aumentos significativos em todos os dias exceto o dia 30 para vísceras e nos dias 6 ao 18 para filé comparando ao dia 0. Para o Mn, o aumento foi em todos os dias de exposição quando comparados ao dia 0 para as vísceras e file, exceto o dia 6 para o filé. No caso do Pb, houve aumento nos dias 3 a 18 comparados ao dia 0 para vísceras e apenas dia 9 e 12 para filé.

Quando analisamos os metais na água no grupo exposto, verificamos concentrações superiores às do dia 0 e em relação ao controle. Considerando ainda o sistema semi-estático de exposição, seria seguro assumir que a bioacumulação dos metais ocorreria, tendo sua origem no MPAS.

Comparando ainda as concentrações dos metais nas vísceras com o filé, constatamos valores maiores para as vísceras para todos os metais analisados. Desse modo, supõe-se que a acumulação destes metais ocorre preferencialmente nas vísceras, pelo menos num período de exposição de 30 dias.

4.5. Fator de Bioacumulação

Os valores de BCF calculados para os metais analisados nas amostras do grupo exposto estão apresentados nas Tabelas 13. O BCF estabelece uma razão entre a concentração no organismo e a no meio, de modo que valores positivos de BCF acima de 1 caracterizam bioacumulação. No presente trabalho, verificaram-se valores de BCF acima de 1 em todos os metais analisados para o grupo exposto ao longo do experimento com exceção do Mn e Pb para os dias 0,18,24 e 30 (Tabela 13).

No geral os metais analisados apresentaram um comportamento comum no padrão de bioacumulação para os peixes expostos. Este padrão foi caracterizado por um aumento significativo nas concentrações nos primeiros dias (dia 3 e 6 para todos os metais). Esse aumento atingiu um máximo (pico) seguido então pela diminuição gradual das concentrações. No caso do Al e Mn verificamos a concentração máxima nos dias 9 e 12 para vísceras e filé, respetivamente. Para o Fe e Pb, a concentração máxima ocorreu nos dias 6 e 9 nas vísceras e 15 no filé, respetivamente.

A Tabela 13 apresenta os valores de BCF calculados para os metais analisados nas amostras do grupo exposto.

TABELA 13: Valores de BCF para Cu, Fe, Al, Mn, Pb e Zn nas amostras peixes do grupo exposto ao MPAS, expressos como média + erro padrão. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p > 0,05$)

DIA	Cu	Fe	Al	Mn	Pb	Zn
0	10,06 ± 6,73 DE	-	-	-	-	56,97 ± 17,13 D
3	3,68 ± 0,73 A	36,01 ± 14,7 A	3,98 ± 1,21 A	4,82 ± 1,06 A	3,98 ± 1,25 A	11,96 ± 0,93 A
6	4,97 ± 0,79 AB	38,06 ± 13,69 A	4,21 ± 0,51 A	5,05 ± 0,63 A	0,98 ± 0,19 A	11,42 ± 0,11 A
9	5,43 ± 0,67 ABC	58,56 ± 32,7 A	6,11 ± 2,97 AB	10,34 ± 4,83 B	9,19 ± 5,01 B	16,82 ± 1,73 AB
12	6,77 ± 1,18 ABCD	54,08 ± 21,18 A	9,38 ± 3,93 B	7,78 ± 2,99 A B	2,75 ± 1,2 A	20,16 ± 3,11 AB
15	8,83 ± 1,45 BCD	133,89 ± 32,16 B	10,24 ± 3 B	21,59 ± 7,36 C	14,7 ± 5,16 C	25,16 ± 1,91 B
18	13,74 ± 2,8 E	-	30,71 ± 5,09 C	-	-	48,1 ± 3,36 CD
24	9,49 ± 1,6 CD	204,83 ± 41,75 C	9,31 ± 1,46 B	-	3,49 ± 0,77 A	44,73 ± 6,34 C
30	8,52 ± 0,23 BCD	571,44 ± 100,43 D	7,2 ± 1,29 AB	-	-	56,77 ± 4,28 D

4.6. Biomarcadores nas brânquias de *O. niloticus*

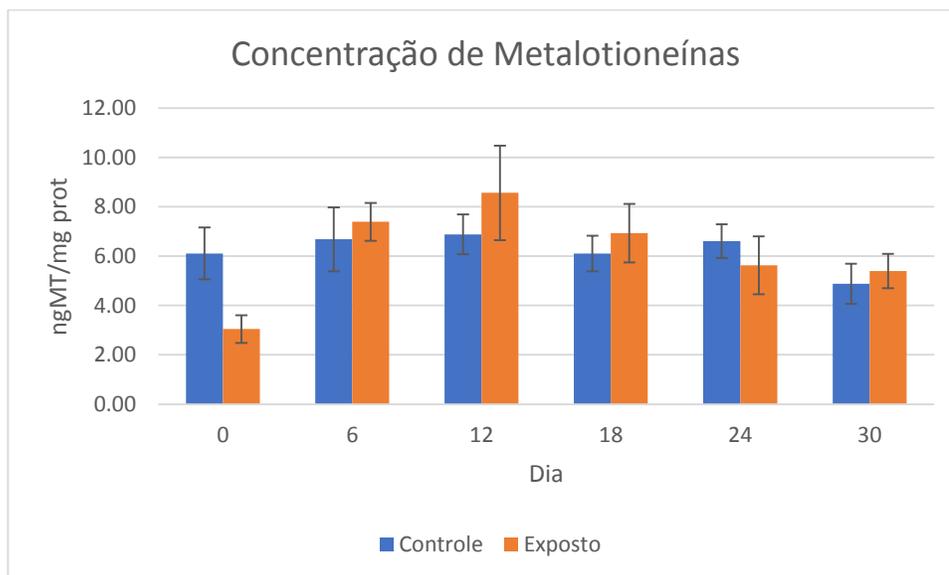
4.6.1. Metalotioneína em brânquias de *O. niloticus*

A concentração de metalotioneína nas amostras de brânquias do grupo controle e exposto ao MPAS estão apresentadas na Tabela 14. Não foi verificada diferença entre os grupos e ao longo dos 30 dias de experimento (Tabela 14)

TABELA 14: Concentrações de metalotioneínas presentes nas diferentes amostras, expressos como média \pm desvio padrão na unidade de ng de MT/mg de proteína. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p > 0,05$); (*)=diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$).

DIA	CONTROLE	EXPOSTO
D0	6,11 \pm 1,82 A	3,05 \pm 1,27 A *
D6	6,68 \pm 3,43 A	7,39 \pm 2,26 B
D12	6,88 \pm 2,13 A	8,57 \pm 4,69 B
D18	6,11 \pm 1,77 A	6,94 \pm 3,14 A B
D24	6,61 \pm 1,68 A	5,63 \pm 2,35 A B
D30	4,88 \pm 1,82 A	5,40 \pm 1,55 A B

FIGURA 15: Variação da concentração de metalotioneína (ng de MT/mg de proteína) nas amostras de brânquias de *O. niloticus* ao longo dos 30 dias de experimento. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p>0,05$); (*) diferença significativa em relação ao controle ($P<0,05$)



4.6.2. Histopatologias em brânquias de *O. niloticus*

A frequência e as alterações histopatológicas registradas para o grupo controle e exposto se encontram na Tabela 15. Dentre estas, as que tiveram maior frequência foram a hipertrofia do epitélio lamelar (HPT) e hipertrofia de ionócitos (HI), com frequências acima de 15% em diversas ocasiões para o grupo exposto ao MPAS. Representações visuais destas patologias podem ser constatadas na Figura 16.

FIGURA 16: Alterações histológicas das brânquias e sua variação ao longo dos dias 0 (A e B, controle e exposto respectivamente), 12 (C e D, controle e exposto respectivamente) e 30 (E e F, controle e exposto respectivamente). Setas pretas indicam hipertrofia do epitélio lamelar; * indica hipertrofia dos ionócitos.

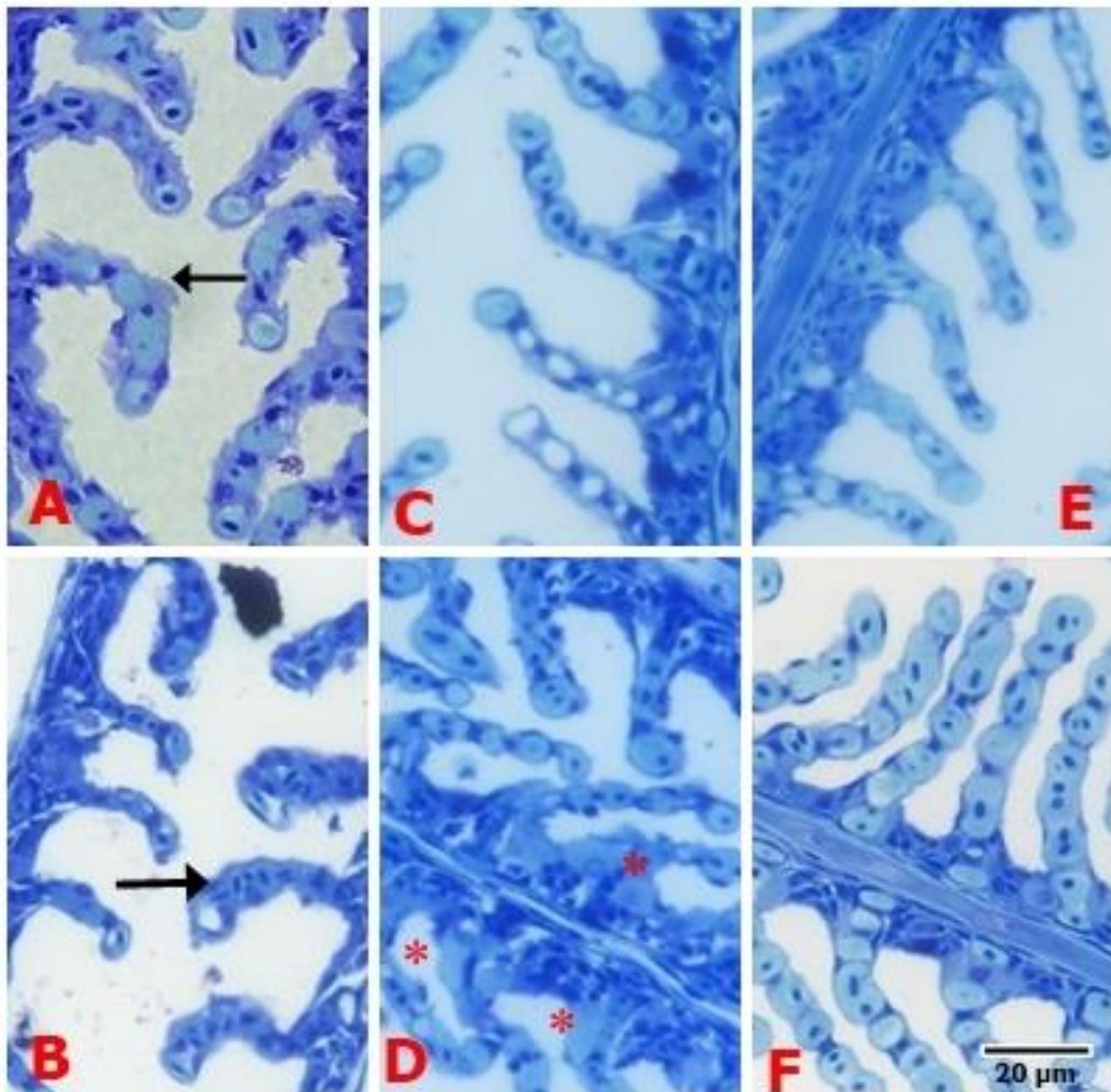


TABELA 15: Frequência (%) das alterações Histopatológicas registradas nas brânquias de *O. niloticus* nos grupos controle e exposto ao MPAS

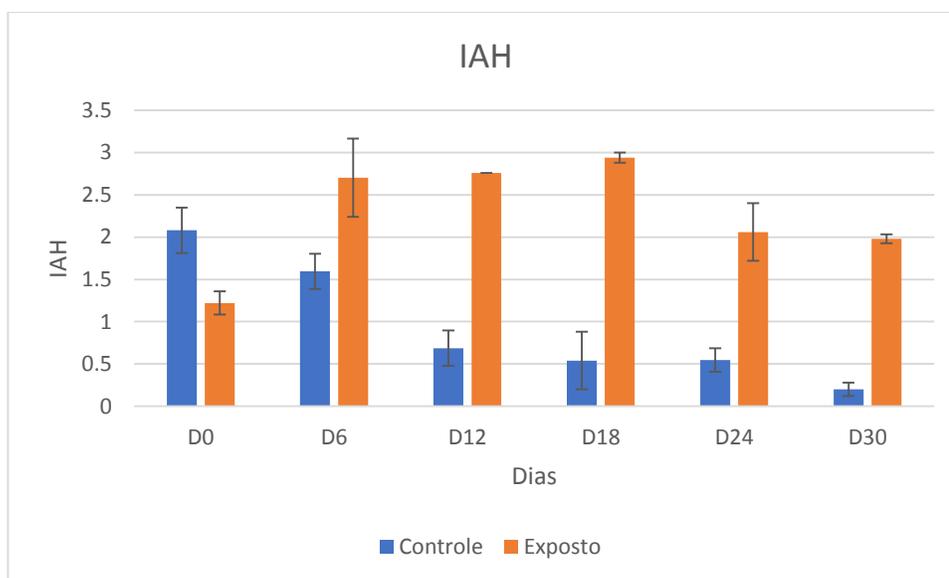
	Controle					
	D0	D6	D12	D18	D24	D30
Hipertrofia do epitélio lamelar	40,7	15,8	10,9	11,2	9,9	5,9
Hiperplasia do epitélio lamelar	0,7	0,4	0,1	0,1	0,1	0
Dilatação do canal marginal	7,3	2,2	2	1,7	2,6	2,3
Constricção do sistema de células pilares	0	0	0	0	0	0
Fusão parcial de lamelas	4,3	0,3	0,5	0,9	1,4	0,1
Aneurisma lamelar	0	0,2	0,1	0	0,1	0
Ruptura epitelial	1,4	0,5	0,1	0,2	0	0
Hipertrofia ionócitos	8	19,5	3,3	5	4	2,8
Proliferação ionócitos	3,5	6,3	0,7	1,6	1,4	1,5
Descolamento epitelial	0,4	3,2	7,3	0,7	0,1	0,1
	Exposto					
	D0	D6	D12	D18	D24	D30
Hipertrofia do epitélio lamelar	28,9	31	19,5	28,2	28	21,1
Hiperplasia do epitélio lamelar	0,8	0	0,2	0	0	0,1
Dilatação do canal marginal	2,3	3,7	2,4	3,5	5,1	6,7
Constricção do sistema de células pilares	0	0	0	0	0	0
Fusão parcial de lamelas	3,4	1,9	1,1	4,1	1,2	0,2
Aneurisma lamelar	0,2	0	0	0	0	0
Ruptura epitelial	0,6	0,7	0,1	0	0,2	0
Hipertrofia ionócitos	3,3	53,7	71,6	63,7	19,5	14,3
Proliferação ionócitos	1,8	10	18,7	16,6	5	8,9
Descolamento epitelial	0,8	1,4	0,2	0,3	0,2	0

O grupo exposto ao MPAS apresenta uma maior frequência de alterações histológicas quando comparada ao grupo controle (Tabela 16). Entretanto, mesmo os maiores valores de IAH para ambos os grupos, 2,08 e 2,94 (controle e exposto respectivamente), não ultrapassaram 10, indicando que as patologias não comprometeram a funcionalidade do órgão.

TABELA 16: Índice de alteração histológica para amostras de Brânquia do grupo Controle e Exposto. Letras diferentes = diferença significativa entre dias de um mesmo grupo (coluna)($p > 0,05$). (*) = diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)

Dia	Controle	Exposto
D0	2,08 ± 0,47 C	1,22 ± 0,14 A
D6	1,60 ± 0,36 BC	2,70 ± 0,46 B
D12	0,69 ± 0,21 AB	2,76 ± 0,00 B
D18	0,54 ± 0,34 AB	2,94 ± 0,06B
D24	0,55 ± 0,20 AB	2,06 ± 0,34 AB
D30	0,20 ± 0,08 A	1,98 ± 0,07AB

FIGURA 17: Variação do IAH de brânquias, expresso em média, ao longo dos dias e diferenças entre grupos (*)=diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,05$)



4.7. Correlação de Spearman

A correlação de Spearman foi calculada para determinar a interdependência de diversos parâmetros. Nas tabelas apresentadas em seguida, apresentaram-se apenas os valores significativos. Os valores variam entre 0 e 1 (0 a 100%). Este valor traduz o grau de interdependência entre os parâmetros.

TABELA 17: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras: Cu com biomarcadores branquiais. Cu-H: cobre na água; Cu-V: amostras viscerais do cobre; Cu-F: amostras do filé do cobre; Cu-T: soma material visceral e filé; Metalo: metalotioneínas; IAH: Índice alteração histopatológica

	Cu-H	Cu-V	Cu-F	Metalo	IAH
Cu-H	-	-	-	0,2553	0,4412
Cu-F	-	-	-	-	-
Cu-V	0,3287	-	-	-	-
Cu-T	0,3167	0,9077	0,5059	-	-

TABELA 18: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras: Fe com biomarcadores branquiais. Fe-H: ferro na água; Fe-V: amostras viscerais do ferro; Fe-F: amostras do filé do ferro; Fe-T: soma material visceral e filé; Metalo: metalotioneínas ; IAH: Índice alteração histopatológica.

	Fe-H	Fe-V	Fe-F	Metalo	IAH
Fe-H	-	0,6623	-	-	0,5125
Fe-F	-	-	-	-	0,7223
Fe-V	0,6917	-	-	-	0,5444
Fe-T	0,6908	0,9908	0,847	-	0,5331

TABELA 19: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras: Al com biomarcadores branquiais. Al-H: alumínio na água; Al-V: amostras viscerais do alumínio; Al-F: amostras do filé do alumínio; Al-T: soma material visceral e filé; Metalo: metalotioneínas; IAH: Índice alteração histopatológica.

	Al-H	Al-V	Al-F	Metalo	IAH
Al-H	-	-	0,7561	0,2034	0,7908
Al-F	-	-	-	-	0,5378
Al-V	0,8099	0,8176	-	-	0,5387
Al-T	0,8072	0,9879	0,8778	-	-

TABELA 20: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras: Cu com biomarcadores branquiais. Zn-H: zinco na água; Zn-V: amostras viscerais do zinco; Zn-F: amostras do filé do zinco; Zn-T: soma material visceral e filé; Metalo: metalotioneínas; IAH: Índice alteração histopatológica.

	Zn-H	Zn-V	Zn-F	Metalo	IAH
Zn-H	0,3512	-	-	0,4371	-
Zn-F	-	-	-	-	-
Zn-V	0,4431	-	0,3002	-	0,3811
Zn-T	0,4176	0,8062	0,7263	-	-

TABELA 21: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras: Cu com biomarcadores branquiais. Mn-H: manganês na água; Mn-V: amostras viscerais do manganês; Mn-F: amostras do filé do manganês; Mn-T: soma material visceral e filé; Metalo: metalotioneínas; IAH: Índice alteração histopatológica.

	Mn-H	Mn-V	Mn-F	Metalo	IAH
Mn-H	-	-	0,6199	-	0,4607
Mn-F	-	-	-	0,2183	0,4046
Mn-V	0,6015	-	0,8615	-	0,3727
Mn-T	0,6027	0,9902	0,9019	-	-

TABELA 22: Valores de correlação após teste Spearman, comparando as diferentes amostras: Cu com biomarcadores branquiais. Pb-H: chumbo na água; Pb-V: amostras viscerais do chumbo; Pb-F: Amostras do filé do chumbo; Pb-T: soma material visceral e filé; Metalo: metalotioneínas; IAH: Índice alteração histopatológica.

	Pb-H	Pb-V	Pb-F	Metalo	IAH
Pb-H	-	-	-	0,2277	-
Pb-F	-	-	-	-	-
Pb-V	0,2628	-	-	-	0,5124
Pb-T	0,2632	0,9677	-	-	0,556

Analisando as correlações, verificamos uma maior correlação das vísceras, quando comparadas ao filé, com a concentração total do metal no organismo para todos os metais (Cu, Fe, Al, Pb, Zn, Mn, Pb) (Tabela 17 a Tabela 22).

Avaliando ainda a correlação obtida, verificamos a ausência de correlação entre a Fe e Mn com MT (Tabela 18, Tabela 21). Quanto aos demais metais (Cu, Zn, Al, Pb) verificamos uma correlação positiva em torno de 0,25 com a concentração dos metais na água. Desse modo, assumimos que 25% do nível de MT encontrado se deve à presença desses metais na água. Aumentos e reduções na concentração dos metais seriam responsáveis por variações na concentração de metalotioneínas presentes na brânquia proporcionalmente numa razão de 1:4 aproximadamente. Em situações que as concentrações dos metais analisados forem superiores aos constatados no presente estudo, é esperado um aumento pronunciado na concentração de MT.

5. DISCUSSÃO

5.1. Parâmetros Físicos e químicos da água e Solubilidade MPAS

O aumento na concentração de metais na água após adição do MPAS, neste estudo, corrobora o estudo de Souza et al. (2021b) que mostrou o potencial de desagregação do MPAS em ambiente aquoso, liberando metais e nanopartículas na água de forma a torná-los biodisponíveis. Assim, verificou-se que a introdução do MPAS na água do grupo exposto aumentou a concentração de metais.

É esperado que a presença destes metais altere as condições fisicoquímicas do meio aquoso. Todavia, as alterações na água ocorreram apenas em relação a condutividade que depende do perfil e concentração de solutos dissolvidos com potencial ionizante, como cátions e ânions (BHATERIA; JAIN, 2016). O aumento da condutividade da água dos aquários do grupo exposto estaria associado à presença dos diversos metais e nanopartículas que constituem o MPAS. Corroborando com essa hipótese, BILGIN; UMUT (2016) demonstraram correlações positivas entre a condutividade medida em amostras de água coletadas no Rio Coruh (Turquia) e os metais Zn, Cd, Co, Cu, Mn encontrados nestas mesmas amostras.

As diferenças entre a concentrações nominal dos metais e medida na água do grupo exposto foram previstas, uma vez que, parte do material particulado se deposita no fundo do aquário ficando apenas uma pequena parte dissolvida na água. A diferença na solubilidade dos metais está associada as características de cada metal e a influência de parâmetros da água como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e atividade biológica de organismos (NAMIEŚNIK; RABAJCZYK, 2015). No entanto, no presente trabalho não se verificaram diferenças para os parâmetros avaliadas da água, assumindo-se então que a diferença residiria principalmente nas características intrínsecas dos metais e/ou atividade biológica de organismos.

Como MPAS, o comportamento dos metais na água apresenta características influenciadas pelo tamanho, como por exemplo a solubilidade. JIANG et al. (2015) avaliando MPA da região urbana portuária de Hong Kong, China, constatou uma solubilidade maior para partículas < 2.5 µm quando comparados aos de 2,5 – 10 µm. A diferença no tamanho poderia então ser um dos fatores determinantes para a solubilidade geral dos metais no presente trabalho. JIANG et al., (2014) reforça a maior solubilidade para PM 2,5 constatando ainda que dos metais analisados Zn, Cd, V, Cu e Mn apresentaram, como PM, maior solubilidade geral em contraste a Cr, Fe, Ni e Al com menor solubilidade. Com a exceção do Al, a ordem de

solubilidade relatada em água se assemelha com a do presente trabalho reforçando então o tamanho das partículas metálicas como fator responsável pelas diferenças na solubilidade destes metais. No caso do Al e Pb, a sua solubilidade é diretamente afetada pelo pH, diminuindo quanto mais próximo o pH ao neutro (pH 7) (WILLIAMS, 1999; WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2012) que foi o registrado para presente trabalho. Desse modo, o pH seria o fator limitante da sua solubilidade no lugar do tamanho.

Já a variação no decorrer do experimento, com a queda na concentração na água dos metais poderia ser associada ao sequestro destes metais para forma insolúvel pelo material orgânico. O sequestro de Pb por muco e escamas de peixe resultando na diminuição da concentração na água já foi descrito por COELLO; KHAN (1996). Adicionalmente, HOLLIS; MUENCH; PLAYLE, (1997) mostraram o potencial que matéria orgânica dissolvida (DOM) possui de complexar com Cu, diminuindo a sua disponibilidade na água.

Verificamos que mesmo com a remoção de dejetos depositados e a renovação parcial da água experimental e MPAS, a redução na concentração dos metais em relação ao início do experimento se manteve. Sendo assim o aumento com o tempo, acúmulo e persistência de DOM na coluna de água poderia realmente ser responsável pela variação na solubilidade dos metais na água. Futuramente, a determinação e caracterização do perfil de DOM em paralelo à dos metais, poderia elucidar a relação de DOM com a solubilidade do MPAS.

5.2. Dinâmica de bioacumulação de metais

5.2.1. Bioacumulação

A bioacumulação corresponde a um processo na qual ocorre a captação e aumento subsequente da concentração de substâncias/contaminantes no organismo exposto ao meio contendo essas substâncias (FERNICOLA et al., 2003). As rotas de entrada, em peixes, podem ser pelas brânquias ou pele, ingestão de material suspenso ou ingestão de alimentos contaminados. A concentração do metal no organismo é determinada pela razão entre as cinéticas de captação e excreção (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003a).

A acumulação de metais em peixes já foi descrita em outros estudos. JAYAPRAKASH et al. (2015) investigaram a presença de metais na água e sedimento e a acumulação em seis espécies diferentes de peixe: *Sillago sihama*, *Liza parsia*, *Etroplus suratensis*, *Oreochromis mossambicus*, *Arius parkii* e *Gerres oyena*; na bacia de Ennore, na Índia. Correlacionaram a presença de Fe, Mn, Cr, Cu, Ni, Co, Pb, Zn, Cd no sedimento e na água com as concentrações

determinadas nos peixes. O potencial de bioacumulação desses metais foi evidenciado com os valores de BAF positivos relacionando a concentração determinada no sedimento e água com a determinada no músculo, fígado e brânquias. TREVIZANI et al. (2019) relataram a presença de Cu, Cr, Ni, Pb, Zn, Hg, As e Se no complexo de estuário de Paranágua, lagoa estuarina Cananéia-Iguape e complexo estuariano de São Vicente. Estes autores determinaram a concentração destes metais na água e nos tecidos dos peixes *Stellifer rastrifer*, *Paralichthys brasiliensis*, e *Isopisthus parvipinnis* concluindo que ocorreu bioacumulação dos metais nas espécies. LOBOS et al. (2019) relataram a presença dos metais Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn em músculo, fígado e brânquias de *Salmo salar* e na água em piscicultura na Região de Los Lagos, região sudeste do Chile e estabeleceram uma correlação com a concentração de metais na água e nos órgãos demonstrando o potencial destes metais de bioacumular no fígado (Cu e Fe) e brânquias (Mn e Zn).

Em relação à acumulação preferencial em diferentes tecidos, RAJESHKUMAR e LI (2018) demonstram em *Cyprinus carpio* e *Pelteobagrus fluvidrac* maior bioacumulação total de metais (Cr, Cu, Cd, Pb) em fígado e brânquias e menor no músculo. ALI et al., (2019) em seu estudo com *Channa gachua* relataram maior bioacumulação de Cu em brânquias e fígado quando comparados ao músculo. Este fenômeno se deve provavelmente à natureza dos metais e ao seu mecanismo transporte e absorção nos tecidos do organismo. No caso do Cu, há evidências que uma das principais rotas de entrada no organismo seriam as brânquias. A captação do Cu pela brânquia se daria então via canais apicais de Na⁺ ou em virtude à sua afinidade em se ligar covalentemente em grupos SH de Na⁺/K⁺-ATPase presentes no órgão (VALERIA et al., 2014). No fígado, a absorção e estocagem do Cu se deve à sua afinidade pelo grupamentos SH das metalotioneínas, que se encontram em altas concentrações no mesmo (HAUSER-DAVIS et al., 2014). SIMONATO et al. (2016) demonstraram que exposição do peixe *Prochilodus lineatus* a concentrações de 9 e 20 ug.L⁻¹ de Cu podem promover alterações como: aumento de lipoperoxidação no fígado; danos no DNA de eritrócitos; inibição de acetilcolinesterase no músculo e cérebro, ocasionando eventualmente perda no desempenho natatório e exploratório. A concentração do trabalho citado foi inferior ao do presente trabalho, no entanto os órgãos alvos foram diferentes.

A estocagem de Fe em excesso na forma de heme proteína e ferritina no fígado além do sequestro pela metalotioneína constituiria o mecanismo de acumulação preferencial deste no fígado (JAVED et al., 2016; ABDEL-KHALEK; BADRAN; MARIE, 2020). Apesar de ser um metal essencial, concentrações em excesso de Fe podem impactar negativamente a homeostase do

organismo (RANJITHA; P, 2020). SINGH et al. (2019) avaliaram alterações fisiológicas e histológicas no peixe *Labeo rohita* mediada pela exposição a ferro nas concentrações de 8,25 , 16,51 e 33,01 mg.L⁻¹ (concentrações superiores às do presente trabalho) em intervalos de 24 ,48 , 72 e 96h. Neste trabalho os autores constataram aumento na peroxidação lipídica com diminuição concomitante da catalase e super óxido dismutase em todas as concentrações do grupo exposto e ainda alterações histológicas nas brânquias como fusão lamelar, hiperplasia e levantamento epitelial. Demonstraram que a severidade das alterações estava diretamente relacionada à concentração e tempo de exposição.

Para o alumínio, a entrada no organismo ocorre principalmente pelas brânquias associada com acumulação em demais órgãos ocorrendo de forma mais lenta (EXLEY; CHAPPELL; BIRCHALL, 1991). Desse modo, o principal sítio de toxicidade do alumínio no organismo ocorre no tecido branquial, com ligação do metal a grupos funcionais apicais da lamela e em células epiteliais promovendo disfunções iônicas e osmorregulatórias. CAMARGO; FERNANDES; MARTINEZ (2009) avaliaram o impacto de Al em pH 5 no peixe *Prochilodus lineatus*. Após exposição a 195 ug.L⁻¹ de Al e constataram uma redução nos íons plasmáticos e na osmolaridade e ainda redução em 50% da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase branquial. Apesar da concentração de Al do trabalho de CAMARGO ser inferior à do presente trabalho, o pH registrado de ambos são diferentes o que influenciaria a solubilidade e biodisponibilidade do mesmo e conseqüentemente a toxicidade. Estas disfunções podem ainda eventualmente acarretar na perda de desempenho cardio-respiratório na natação, apetite, do crescimento e sucesso reprodutivo (WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2012).

No caso do Zinco, um elemento essencial que já ocorre naturalmente no organismo, rotas de entrada correspondem à captação pelas brânquias quando disponível na água e pelo intestino através da dieta (WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2011). O Zn é um antagonista de Ca, de modo que a exposição de Zn na água pode levar a hipocalcemia em peixes por inibir a captação de Ca pelas brânquias (HOGSTRAND; REID; WOOD, 1995). LUCIA et al., (2012) expuseram o peixe *Fundulus heteroclitus* a uma concentração subletal de Zn (500 ug.L⁻¹) por 96h variando ainda a salinidade do meio. Avaliaram os efeitos para marcadores de estresse oxidativo nas brânquias, fígado, rim e músculo. Constataram que para a água doce, o Zn promovera alterações semelhantes para todos os tecidos com redução na atividade da superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), glutatona (GSH) e catalase, confirmando o potencial do Zn como estressor oxidativo. A concentração no estudo de Lucia e colaboradores foi superior às concentrações de Zn no presente trabalho.

A principal rota de entrada de Pb pelo trato digestivo mediante ingestão estaria relacionada a capacidade de “mimetismo” de outros metais e íons e se ligar a seus transportadores específicos. Na brânquia e na epiderme, por exemplo, ocorre pela ligação em canais de Ca nos ionócitos. A captação e transporte no interior do organismo ocorre por ligantes e transportadores de Zn e Fe (WOOD; FARRELL; BRAUNER, 2012). O Pb apresenta alta toxicidade para peixes desencadeando respostas deletérias como estresse oxidativo, neurotoxicidade e imunocomprometimento (LEE et al., 2019). EROGLU et al. (2015) avaliou efeito que metais pesados teriam no metabolismo oxidativo do fígado de *Oreochromis niloticus*. No estudo, a exposição no caso de Pb em concentrações de 1 ug.mL^{-1} (equivalente a 1000 ug.L^{-1} , concentração superior à do presente estudo) ocasionou aumento da atividade da GST e diminuição da GSH.

A diferença evidenciada pra acumulação dos metais nas vísceras preferencialmente ao filé residiria então na rota de entrada e principais tecidos de metabolização como fígado e rim. A brânquia pelo seu contato direto com o meio poluído seria dos primeiros tecidos a bioacumular, ocorrendo subsequentemente o transporte dos metais pelo sangue aos demais tecidos e acumulação nestes. Isto é evidenciado por STRUNGARU et al. (2018) que avaliaram o padrão de acumulação de Cu e Cd em 8 espécies peixes no rio Prut, România, no período de 3 meses. Dentre os resultados constataram um acúmulo preferencial e superior destes metais no fígado e rins comparados ao acúmulo no sangue, gônadas, trato digestório, brânquias e músculo. De fato, padrão similar é evidenciado por ANANDKUMAR et al. (2018) ao determinar a concentração de metais (Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, e Pb) em 7 espécies distintas peixes (2 pelágicos e 5 demersais) coletados na costa de Miri, Malásia. Concluíram que a sequência de acumulação dos metais nos diferentes tecidos seria: fígado > brânquia > gônada > músculo.

5.2.2. Padrão de bioacumulação

No geral, os metais analisados apresentaram um padrão de bioacumulação no grupo exposto. Este padrão foi caracterizado por um aumento significativo nas concentrações de metais nas vísceras nos primeiros dias de exposição até atingir um máximo (6 a 15 dias, dependendo do metal) seguido então por uma diminuição gradual. A diferença no período para atingir a concentração máxima nas vísceras e filé reforça a tendência ao acúmulo preferencial em tecidos viscerais já descrito por RAJESHKUMAR e LI (2018). O pico descrito no padrão representa o período de saturação na cinética de captação e transporte para os tecidos viscerais (VALERIA et al., 2014). A taxa de excreção total de cada metal no organismo seria então diretamente

dependente do principal órgão de acumulação. MANSOURI & EBRAHIMPOUR (2011) ressaltaram diferenças na bioacumulação e excreção de Ni em diversos tecidos e registraram que a acumulação deste metal seguia preferencialmente a seguinte ordem brânquias > fígado > músculo > pele; em contraste, à excreção ocorria preferencialmente via brânquias > pele > músculo > fígado.

HOSSEIN et al. (2020) relatam diferenças na dinâmica de captação e excreção de em fígado, intestino, rim e brânquias de *Capoeta fusca* ao Fe e nanopartículas de Fe. Brânquias e intestino apresentaram maiores acúmulo de Fe comparados com o fígado e rim. Este fenômeno foi atribuído ao contato direto das brânquias com a água e contato da mucosa intestinal com material contaminado ingerido. A maior taxa de excreção do Fe foi encontrada nas brânquias, associada novamente ao contato direto destas com o meio, possibilitando a difusão para água. Em contraste, as menores taxas de excreção foram encontradas no intestino e fígado, devendo-se à possibilidade de ligação do Fe em proteínas de estocagem como ferritina. Desse modo, apesar da possível rápida excreção pelas brânquias num primeiro instante, uma menor taxa de excreção de outros tecidos seria responsável por manter a concentração do Fe em concentrações elevadas nas vísceras quando comparadas ao início da exposição.

Apesar do Cu registrar um aumento considerável nos primeiros dias, não foi possível evidenciar a ocorrência de um padrão similar aos demais metais. O padrão de bioacumulação do Cu para o grupo exposto ao MPAS apresentou diversos picos (dias 6, 15 e 24) para material visceral. GUO et al., (2016) estudando diferentes estágios do peixe *Oryzias melastigma*, verificou excreção acentuada de Cu nos primeiros 4 dias seguida de excreção menos acentuada do 4º. ao 28º. dia, diminuindo na medida que avançavam nos 28 dias de exposição. A ocorrência de um fenômeno semelhante no presente trabalho poderia explicar a manutenção das altas concentrações de cobre ao longo de um período quando comparado aos demais metais. ZHOU et al. (2018) no seu estudo com o peixe *Siganus oramin* descreveram um aumento na acumulação de Cu durante 30 dias, porém sem atingir um plateau de saturação pelo período do exposição. Constataram ainda a excreção acelerada de Cu nos primeiros dois dias de exposição seguida da diminuição na taxa de excreção a partir deste 2º dia. Estes resultados corroboram a hipótese apresentada para o padrão de bioacumulação do Cu no presente trabalho.

Tal como descrito para o Cu, o Zn não apresentou um padrão similar aos demais metais para o material visceral. Ao contrário dos demais metais, o zinco apresentou um segundo pico máximo de bioacumulação provavelmente relacionado a diferenças na bioacumulação de diferentes tecidos. ABDEL-TAWWAB; EL-SAYED; SHADY (2016) demonstraram em tilápia-do-

Nilo que a concentração de Zn em brânquias, fígado, rim e músculo estava diretamente relacionada com o tempo de exposição. Após 1 semana de exposição a ordem de acumulação de Zn nos tecidos foi brânquias > fígado > rim > músculo em contraste, após 6 semanas, a ordem foi fígado>rim >brânquias>músculo. Este estudo sugere uma acumulação preferencial num primeiro instante nas brânquias seguida pelo transporte e então acumulação preferencial em demais tecidos viscerais para demais dias.

5.2.3. Limites diários e saúde humana

O presente estudo demonstrou o potencial destes metais de acumularem nas vísceras e filé ao longo do tempo em diferentes concentrações. Considerando que a contaminação do filé pode causar efeitos deletérios ao ser humano, uma vez que é parte da alimentação. Neste contexto, a bioacumulação destes metais no músculo/filé é preocupante quando considerados os limites para consumo humano com segurança estabelecidos pela USEPA.

TABELA 23: Comparação entre o limite diário (mg) estabelecido pela USEPA (USEPA 2020) e a ingestão estimada de Cu, Fe, Al, Zn, Mn e Pb (mg) pelo consumo de 150 g de filé ou vísceras considerando a maior concentração determinada e a concentração referente ao dia 30 para cada metal.

Metais	USEPA	Consumo Filé		Consumo Vísceras	
	Limite diário (mg)	Maior []	Após 30 dias	Maior []	Após 30 dias
Cu	2,8	3,0	1,41	11,2	9,21
Fe	49	518,2	80,30	3323,5	1248,63
Al	70	51,1	13,10	402,7	167,02
Zn	21	37,7	18,74	41,0	25,28
Mn	9,8	4,4	1,69	31,4	1,69
Pb	0,30	0,3	0,03	2,7	0,88

O consumo do filé de peixes expostos ao MPAS pode apresentar um risco à saúde humana em vista à concentração determinada nestes ser superior aos limites estabelecidos (Tabela 23). Os limites são estabelecidos com base no potencial toxicológico para humanos que os metais apresentam. OE et al. (2016) demonstraram o potencial hepatotxicológico do Cu

determinando a ocorrência, *in vitro*, de estresse oxidativo, alterações no retículo endoplasmático, apoptose e danos no DNA. A toxicidade da concentração excessiva de Al envolve principalmente a neurotoxicidade, estresse oxidativo, apoptose celular por disfunção mitocondrial além de afetar o sistema hematopoiético e esquelético (STAHL et al., 2017). A toxicidade de Mn , pelo potencial como disruptor dopaminérgico , tem sido associado a patologias neurológicas (NEAL; ZHENG, 2015). No caso do Pb é documentado sua toxicidade neurológica, hematológica, reprodutiva, gastrointestinal e imunológica associado geralmente ao seu potencial de induzir estresse oxidativo (PATRICK, 2006).

5.3. Biomarcadores nas brânquias de *O. niloticus*

5.3.1. Metalotioneínas

Metalotioneínas são proteínas que se ligam a metais, atuando na regulação celular dos níveis de metais como Cu e Zn, entre outros e constituem uma importante via de detoxificação de metais no geral (HAUSER-DAVIS et al., 2012). A ausência de alteração na concentração de metalotioneínas nas brânquias do grupo exposto ao MPAS quando comparado ao controle pode se associar a 2 fatores.

O primeiro refere-se a rota de captação de metais pelo peixe. A captação de metais do ambiente pelo peixe pode ocorrer principalmente por duas vias: captação direta pelo contato das brânquias com o meio e pela mucosa intestinal em contato com alimento e/ou sedimento contaminado advindos da dieta (SAULIUTÉ, GINTARÉ; SVECEVICIUS, 2015).

Quanto ao segundo fator, os níveis de metais acumulados na brânquia poderiam não ser suficientes para induzir alterações nos níveis de MT no grupo exposto ao MPAS. Sendo assim, assume-se a ocorrência de uma acumulação preferencial de metais em outras matrizes teciduais quando comparados à brânquia. Esta situação é descrita por SOW et al (2019) em seu estudo de análise da concentração de metais na enguia *Monopterus Albus*. SOW et al. demonstraram acumulação preferencial de Ni, Zn e Pb nas brânquias quando comparados aos demais tecidos enquanto principal tecido de acumulação do Cu foi o fígado. Contudo, os autores demonstraram correlação mais significativa entre os metais e a MT no fígado quando comparado à brânquia. Este parece ser o caso para o presente trabalho visto a ausência de correlação entre a concentração de MT analisadas nas brânquias com as concentrações de metais determinadas nas vísceras.

5.3.2. Histopatologias

Patologias podem alterar a funcionalidade de tecidos quando presentes. O impacto varia de formas leves a perda total da funcionalidade do órgão dependendo da frequência e da gravidade deste. A frequência alta de HPT no início do experimento no controle seria decorrente de condições do meio ao qual estavam aclimatados previamente ao início do experimento. A ocorrência de situação similar no grupo exposto para o mesmo dia atestaria a última hipótese, em vista que espécimes de ambos os grupos experimentais teriam sido selecionados aleatoriamente de um mesmo lote.

As brânquias são órgãos que possuem grande plasticidade, alterando sua estrutura frente a diferentes estressores ambientais garantindo a sobrevivência do indivíduo (SOLLID; NILSSON, 2006; SACKVILLE; BRAUNER, 2018). Mais ainda, é documentado a capacidade destas de se adaptarem ao estressor e recuperarem a funcionalidade comprometida por patologias (FERREIRA et al., 2017). Este potencial foi verificado no presente estudo pela regressão do quadro de patologias apresentadas pelas brânquias do grupo controle. Já para o exposto, a manutenção deste quadro por um período prolongado se deveria à presença do MPAS.

A hipertrofia do epitélio lamelar constitui um mecanismo de defesa aumentando a distância para difusão e dificultando a entrada de compostos tóxicos na brânquia (FERREIRA et al., 2017). No entanto, esse aumento pode diminuir a captação de oxigênio e comprometer capacidade respiratória do indivíduo (NUNES et al., 2015; SAYED; MEKKAWY; MAHMOUD, 2012). Alterações relacionadas aos ionócitos estão relacionadas a mecanismo de defesa; as ionócitos atuam principalmente na regulação iônica e ácido-base pelo fluxo de Ca^{2+} e Cl^- , ajustando sua área de superfície apical em situações estressantes. Em meio alcalino verifica-se aumento da área apical em contraste ao meio ácido que se verifica uma diminuição desta área, aumentando ou diminuindo o número de trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ funcionais (PERRY, 1997). No entanto, em alguns casos, ocorre a proliferação pela lamela configurando-se uma barreira para difusão de oxigênio e comprometendo a funcionalidade da brânquia (PERRY, 1997). A hiperplasia e proliferação das células cloreto foram constatados no presente trabalho para o grupo exposto, reforçando a então o potencial dos metais como estressores e possivelmente afetando a regulação iônica. Similar resposta foi demonstrada também por (AWALUDIN et al., 2019), na qual a exposição crônica (28 dias) a cádmio do peixe *Gambusia affinis* promoveu aumento da área das células cloreto.

Com base no IAH estas alterações histológicas não comprometem o funcionamento da brânquia. Contudo, prevê-se que a exposição a concentrações mais altas de metais poderiam desencadear efeitos mais pronunciados nas brânquias, uma vez que se verificou uma correlação positiva entre a concentração dos metais na água (Cu, Al, Mn e Fe) e nas vísceras (Zn, Al, Pb, Mn e Fe) e o IAH. A hipótese é corroborada pelo trabalho de ZHENG et al. (2011) expondo o peixe *Synechogobius hasta* a Zn e avaliando alterações histológicas na brânquia e atividade enzimática. Dentre os resultados, Zheng destacou descolamento do epitélio lamelar, congestão vascular, aneurismas, edema no epitélio filamental e hiperplasia do epitélio lamelar primário. No estudo citado, a concentração de Zn seria superior ($19,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de Zn no 12º dia de exposição) quando comparado ao maior valor registrado de Zn na água do presente trabalho ($35,732 \mu\text{g/L}$).

Uma situação semelhante é registrada por PAULINO et al. (2014) ao analisar diferentes locais de um reservatório de uma usina hidroelétrica quanto à bioacumulação de metais e organoclorados nos peixes *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus*. O autor relata menores valores de IAH para brânquias em pontos de coleta nas quais afirma ocorrer uma menor acumulação de metais contrastando a maiores valores de IAH em pontos com maiores acumulação.

A interação entre metais poderia constituir um outro fator responsável pelos efeitos observados. NNAMDI et al. (2019) relata no seu trabalho com nanopartículas metálicas, um efeito tóxico reduzido nas brânquias para misturas de Cu, Si e Al quando comparados ao efeito isolados. Desse modo, sugere uma relação antagonista entre esses metais, pelo menos na forma de nanopartículas. SAIBU et al., (2018) determinaram a distribuição de Zn nas brânquias de *Oncorhynchus mykiss* e alteração advinda da interação com Cd e Cu. Concluíram que existiria um potencial papel competitivo/antagonista entre Zn e Cd mas não entre Zn e Cu. Estes trabalhos reforçam o potencial de metais de interagirem antagonicamente ou sinergicamente entre si e promoverem alterações no organismo. Estudos futuros avaliando as interações dos metais no MPAS poderiam elucidar com mais detalhes o impacto da mistura nas brânquias.

6. Conclusões

O presente trabalho avaliou e identificou a presença de metais presentes no MPAS oriundo da atividade minero-siderúrgica do complexo de Tubarão em Vitória.

Foi verificado que a dissolução do MPAS no meio aquoso é incompleta com sedimentação de grande parte do material. A solubilidade dos metais presentes é heterogênea com o Cu, Zn, Mn, Al apresentando solubilidades semelhantes enquanto Fe e Pb apresentaram a menor solubilidade.

O acúmulo de metais nos organismos apresenta heterogeneidade, acumulando-se preferencialmente em tecidos viscerais em relação ao filé. A concentração no filé apresentou valores superiores aos limites de consumo estabelecidos pela USEPA reforçando o seu risco ao consumo humano.

O padrão de bioacumulação dos metais foi caracterizado pelo aumento acentuado inicial com subsequente queda na concentração com exceção do Cu e Zn que evidenciou a persistência desses metais no organismo.

As concentrações de metais presentes no MPAS não comprometeram a funcionalidade da brânquia e não alteraram a concentração de MT nas brânquias. Todavia efeitos subletais, como alterações histopatológicas, foram registradas ao longo da exposição.

7. Referências Bibliográficas

ABDEL-KHALEK, A. A.; BADRAN, S. R.; MARIE, M. S. The Efficient Role of Rice Husk in Reducing the Toxicity of Iron and Aluminum Oxides Nanoparticles in *Oreochromis niloticus*: Hematological, Bioaccumulation, and Histological Endpoints. **Water Air Soil Pollution**, v. 231, n. 53, 2020.

ABDEL-SATAR, A. M.; ALI, M. H.; GOHER, M. E. Indices of water quality and metal pollution of Nile. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 43, n. 1, p. 21–29, 2017.

ABDEL-TAWWAB, M.; EL-SAYED, G.; SHADY, S. H.; Growth, biochemical variables, and zinc bioaccumulation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) as affected by water-born zinc toxicity and exposure period. **International Aquatic Research**, v. 8, n. 3, p. 197–206, 2016.

ABDEL-TAWWAB, M. et al. Fish response to hypoxia stress: growth, physiological, and immunological biomarkers. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 997–1013, 2019.

AGARWAL, A. et al. Pesticide residue in water—a challenging task in India. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 2, 2015.

ALI, H. et al. Assessment of Cu and Zn in Water, Sediments and in the Carnivorous Fish, *Channa gachua* from River Swat and River Barandu, Malakand Division, Pakistan. **Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science**, v. 43, n. 3, p. 773–783, 2019.

ANANDKUMAR, A. et al. Human health risk assessment and bioaccumulation of trace metals in fish species collected from the Miri coast, Sarawak, Borneo. **Marine Pollution Bulletin**, v. 133, n. February, p. 655–663, 2018.

ARDESHIR, R. A.; MOVAHEDINIA, A.; RASTGAR, S. Fish Liver Biomarkers for Heavy Metal Pollution: A Review Article. **American Journal of Toxicology**, v. 2, n. June, p. 1–8, 2017.

ARRIVABENE, H. P. et al. Effect of pollution by particulate iron on the morphoanatomy, histochemistry, and bioaccumulation of three mangrove plant species in Brazil. **Chemosphere**, v. 127, p. 27–34, 2015.

AWALUDIN, M. et al. The effect of cadmium exposure on the cytoskeleton and morphology of the gill chloride cells in juvenile mosquito fish (*Gambusia affinis*). **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 4, p. 337–343, 2019.

BHATERIA, R.; JAIN, D. Water quality assessment of lake water: a review. **Sustainable Water Resources Management**, v. 2, n. 2, p. 161–173, 2016.

BILGIN, A.; UMUT, M. Evaluation of surface water quality and heavy metal pollution of Coruh River Basin (Turkey) by multivariate statistical methods. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, 2016.

BONOMO, M. M. et al. Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. **Environmental Pollution**, v. 268, 2021.

BUNDSCHUH, M. et al. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? **Environmental Sciences Europe**, v. 30, n. 1, 2018.

CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 40–46, 2009.

CANONICO, G. C. et al. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 15, n. 5, p. 463–483, 2005.

CHIBA, W. et al. Seasonal study of contamination by metal in water and sediment in a sub-basin in the southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 4, p. 833–843, 2011.

COELLO, W. E.; KHAN, M. A. Q. Protection Against Heavy Metal Toxicity by Mucus and Scales in Fish *. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 326, p. 319–326, 1996.

DA SILVA, C. P.; DA SILVEIRA, E. L.; DE CAMPOS, S. X. Environmental pollution by heavy metals in the São João River basin, southern Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 76, n. 16, 2017.

DA SOUZA, I. et al. Adaptive plasticity of *Laguncularia racemosa* in response to different environmental conditions: Integrating chemical and biological data by chemometrics. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 335–348, 2014.

DALLINGER, R. CHAPTER 14: Strategies of Metal Detoxification in Terrestrial Invertebrates. In: **Ecotoxicology of metals in invertebrates**. [s.l: s.n.]. p. 245–289.

DUAN, J. et al. Comprehensive understanding of PM_{2.5} on gene and microRNA expression patterns in zebra fish (*Danio rerio*) model. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 666–674, 2017.

DUARTE, A. L. et al. Hazardous elements and amorphous nanoparticles in historical estuary coal mining area. **Geoscience Frontiers**, v. 10, n. 3, p. 927–939, 2019.

EROGLU, A. et al. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 3229–3237, 2015.

EXLEY, C.; CHAPPELL, J. S.; BIRCHALL, J. D. A Mechanism for Acute Aluminium Toxicity in Fish. **Journal of Theoretical biology**, n. 151, p. 417–428, 1991.

FERREIRA, C. et al. Proliferation, survival and cell death in fish gills remodeling: From injury to recovery. **Fish & Shellfish Immunology journal**, v. 68, p. 10–18, 2017.

GIESE, B. et al. Risks, Release and Concentrations of Engineered Nanomaterial in the

Environment. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–18, 2018.

GUO, Z. et al. Developmental patterns of copper bioaccumulation in a marine fish model *Oryzias melastigma*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 216–222, 2016.

HAO, Z. et al. Heavy metal distribution and bioaccumulation ability in marine organisms from coastal regions of Hainan and Zhoushan, China. **Chemosphere**, v. 226, p. 340–350, 2019.

HARSHA, K.; SENTHIL, P.; PANDA, R. C. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 111197, 2019.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. A novel report of metallothioneins in fish bile: SDS-PAGE analysis, spectrophotometry quantification and metal speciation characterization by liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Aquatic Toxicology**, v. 117, p. 54–60, 2012.

HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 1, p. 70–74, 2014.

HOGSTRAND, C.; REID, S. D.; WOOD, C. M. Ca²⁺ VERSUS Zn²⁺ TRANSPORT IN THE GILLS OF FRESHWATER RAINBOW TROUT AND THE COST OF ADAPTATION TO WATERBORNE Zn²⁺. **Journal of Experimental Biology**, v. 348, p. 337–348, 1995.

HOLLIS, L.; MUENCH, L.; PLAYLE, R. C. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p. 703–720, 1997.

HOSSEIN, M. et al. Exposure effects of iron oxide nanoparticles and iron salts in black fish (*Capoeta fusca*): Acute toxicity, bioaccumulation, depuration, and tissue histopathology. **Chemosphere**, v. 247, p. 125900, 2020.

HUANG, X. et al. Effects of copper on hemocyte parameters in the estuarine oyster *Crassostrea rivularis* under low pH conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 203, n. July, p. 61–68, 2018.

JAVED, M. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Bioaccumulation, oxidative stress and genotoxicity in fish (*Channa punctatus*) exposed to a thermal power plant effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 163–169, 2016.

JAYAPRAKASH, M. et al. Bioaccumulation of metals in fish species from water and sediments in macrotidal Ennore creek, Chennai, SE coast of India: A metropolitan city effect. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 243–255, 2015.

JIANG, S. Y. et al. Source apportionment and water solubility of metals in size segregated particles in urban environments. **Science of the Total Environment**, v. 533, p. 347–355, 2015.

JIANG, S. Y. N. et al. Water solubility of metals in coarse PM and PM_{2.5} in typical urban

environment in Hong Kong. **Atmospheric Pollution Research**, v. 5, n. 2, p. 236–244, 2014.

KELLER, A. A. et al. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 6, 2013.

KELLER, A. A.; LAZAREVA, A. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 1, n. 1, p. 65–70, 2013.

KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. **A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review**. [s.l: s.n.]. v. 12

KUMAR, H. et al. Metallic Nanoparticle : A Review. **Biomedical journal of scientific & Technical Research**, v. 4, n. 2, p. 3765–3775, 2018.

LEAD, J. R. et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects—An updated review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 8, p. 2029–2063, 2018.

LEE, J. et al. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation , oxidative stress , neurotoxicity , and immune responses in fish : A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 68, n. October 2018, p. 101–108, 2019.

LIU, J. et al. Impact of wastewater effluent containing aged nanoparticles and other components on biological activities of the soil microbiome, Arabidopsis plants, and earthworms. **Environmental Research**, v. 164, n. November 2017, p. 197–203, 2018.

LOBOS, M. G. et al. Distribution of Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in Liver, Gills and Muscle of Early Life Stages of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 3, p. 419–424, 2019.

LUCIA, V. et al. Oxidative stress parameters and antioxidant response to sublethal waterborne zinc in a euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus* : Protective effects of salinity. **Aquatic Toxicology**, v. 110–111, p. 187–193, 2012.

MA'RIFAH, F. et al. The change of metallothionein and oxidative response in gills of the *Oreochromis niloticus* after exposure to copper. **Animals**, v. 9, n. 6, p. 1–11, 2019.

MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). **Toxicology and Industrial Health**, 2011.

MISHRA, S.; BHARAGAVA, R. N.; MORE, N. Heavy Metal Contamination : An Alarming Threat to Environment and Human Health. **Environmental Biotechnology: For Sustainable Future**, 2019.

NAMIEŚNIK, J.; RABAJCZYK, A. The speciation and physico-chemical forms of metals in surface waters and sediments Review. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 2299, 2015.

NEAL, S. L. O.; ZHENG, W. Manganese Toxicity Upon Overexposure : a Decade in Review. p. 315–328, 2015.

NNAMDI, A. H. et al. Antagonistic Effects of Sublethal Concentrations of Certain Mixtures of Metal Oxide Nanoparticles and the Bulk (Al_2O_3 , CuO , and SiO_2) on Gill Histology in *Clarias gariepinus*. **Journal of Nanotechnology**, v. 2019, p. 11, 2019.

NUNES, B. et al. Acute Effects of Tetracycline Exposure in the Freshwater Fish *Gambusia holbrooki* : Antioxidant Effects , Neurotoxicity and Histological Alterations. p. 371–381, 2015.

OE, S. et al. Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 1, p. 192–200, 2016.

OOST, D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : A review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 6689, n. February, 2003a.

OOST, D.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57–149, 2003b.

PART, F. et al. A review of the fate of engineered nanomaterials in municipal solid waste streams. **Waste Management**, v. 75, p. 427–449, 2018.

PATRICK, L. Lead Toxicity Part II : The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity Lead / Antioxidants. **Alternative Medicine Review**, v. 11, n. 2, 2006.

PAULINO, M. et al. The impact of organochlorines and metals on wild fish living in a tropical hydroelectric reservoir : bioaccumulation and histopathological biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 497–498, p. 293–306, 2014.

PERRY, S. F. THE CHLORIDE CELL : Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**, n. 59, p. 325–347, 1997.

RAJESHKUMAR, S.; LI, X. Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. **Toxicology Reports**, v. 5, n. February, p. 288–295, 2018.

RANJITHA, T.; P, S. C. S. Biological and ecological impact of iron and iron nanoparticles across diverse array of fish models : A review. **ECOLOGY, ENVIRONMENT AND CONSERVATION**, v. 26, n. 1, p. 180–184, 2020.

RASTOGI, S.; YADAV, P.; SINGH, M. CADMIUM TOXICITY AND ITS EFFECT ON THE HISTOLOPATHOLOGY OF LIVER AND KIDNEY OF THE FRESH WATER TELEOST, *HETEROPNEUSTES FOSSILIS* (BLOCH). **INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC**

RESEARCH, v. 7, n. 6, p. 8–10, 2018.

REBOA, A. et al. Baseline evaluation of metal contamination in teleost fishes of the Gulf of Tigullio (north-western Italy): Histopathology and chemical analysis. **Marine Pollution Bulletin**, v. 141, n. December 2018, p. 16–23, 2019.

REZAPOUR, S. et al. Heavy metal bioavailability and accumulation in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) irrigated with treated wastewater in calcareous soils. **Science of the Total Environment**, v. 656, p. 261–269, 2019.

SACKVILLE, M. A.; BRAUNER, C. J. Case Study: Gill Plasticity in Larval Fishes. In: **Development and Environment**. [s.l.: s.n.]. p. 377–400.

SAIBU, Y. et al. Distribution and speciation of zinc in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during acute waterborne zinc exposure: Interactions with cadmium or copper. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 206–207, n. February, p. 23–31, 2018.

SANTOS, J. M. et al. Source apportionment of settleable particles in an impacted urban and industrialized region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 22026–22039, 2017.

SAULIUTÉ, GINTARÉ; SVECEVICIUS, G. Heavy metal interactions during accumulation via direct route in fish: A review Gintarė Sauliutė & Gintaras Svecevičius. **Zoology and Ecology**, n. January, 2015.

SAYED, A. E. H.; MEKKAWY, I. A.; MAHMOUD, U. M. Histopathological Alterations in some Body Organs of Adult *Clarias gariepinus*. In: **Zoology**. [s.l.: s.n.]. p. 206.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. **Environment International**, v. 37, n. 6, p. 1083–1097, 2011.

SIMONATO, J. D. et al. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31–41, 2016.

SINGH, M. et al. Iron mediated hematological, oxidative and histological alterations in freshwater fish *Labeo rohita*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, n. December 2018, p. 87–97, 2019.

SOLLID, J.; NILSSON, E. Plasticity of respiratory structures — Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature &. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 154, p. 241–251, 2006.

SOUZA, C. et al. Nanoparticle transport and sequestration: Intracellular titanium dioxide nanoparticles in a neotropical fish. **Science of the Total Environment**, v. 658, p. 798–808, 2019.

SOUZA, I. C. et al. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and

biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, v. 180, p. 136–144, 2013a.

SOUZA, I. C. et al. Matching metal pollution with bioavailability , bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, v. 180, p. 136–144, 2013b.

SOUZA, I. C. et al. Trophic transfer of emerging metallic contaminants in a neotropical mangrove ecosystem food web. **Journal of Hazardous Materials**, p. 124424, 2021.

SOUZA, I. DA C. et al. Matching pollution with adaptive changes in mangrove plants by multivariate statistics. A case study, *Rhizophora mangle* from four neotropical mangroves in Brazil. **Chemosphere**, v. 108, p. 115–124, 2014.

SOUZA, I. DA C. et al. Changes in bioaccumulation and translocation patterns between root and leaves of *Avicennia schaueriana* as adaptive response to different levels of metals in mangrove system. **Marine Pollution Bulletin**, v. 94, n. 1–2, p. 176–184, 2015.

SOUZA, I. DA C. et al. Interrogating pollution sources in a mangrove food web using multiple stable isotopes. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 501–511, 2018.

SOW, A. Y. et al. Seasonal variation of heavy metals and metallothionein contents in Asian swamp eels , *Monopterus albus* (*Zuiew* , 1793) from Tumpat, Kelantan, Malaysia. **BMC Pharmacology and Toxicology**, p. 1–8, 2019.

STAHL, T. et al. Migration of aluminum from food contact materials to food — a health risk for consumers ? Part I of III : exposure to aluminum , release of aluminum , tolerable weekly intake (TWI), toxicological effects of aluminum , study design , and methods. **Environmental Sciences Europe**, 2017.

STRUNGARU, S. et al. Patterns of toxic metals bioaccumulation in a cross-border freshwater reservoir. **Chemosphere**, v. 207, p. 192–202, 2018.

TREVIZANI, T. H.; DOMIT, C.; VEDOLIN, M. C. Assessment of metal contamination in fish from estuaries of southern and southeastern Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, p. 191:308, 2019.

UNITED NATIONS: DEPARTMENT OF SOCIAL AND ECONOMIC AFFAIRS. **World population prospects: The 2017 Population Division 2013**. New York: [s.n.]. Disponível em: <<http://esa.un.org/unpd/wpp/Excel-Data/population.htm>>.

VALERIA, M. et al. Kinetics of bioaccumulation of heavy metals in *Odontesthes bonariensis* is explained by a single and common mechanism Kinetics of bioaccumulation of heavy metals in *Odontesthes bonariensis* is explained by a single and common mechanism. **Ecological Modelling**, v. 274, n. February, p. 50–56, 2014.

VICENTE, I.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil Prospects of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in Brazil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392–398, 2014.

WANG, X. et al. Heavy metal pollution in reservoirs in the hilly area of southern China : Distribution , source apportionment and health risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 158–169, 2018.

WILLIAMS, R. J. P. What is wrong with aluminium ? 1 The J . D . Birchall memorial lecture. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 76, p. 81–88, 1999.

WOOD, C. M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Fish Physiology Volume 31A: Homeostasis and Toxicology of essential Metals**. [s.l: s.n.].

WOOD, C. M.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. **Fish Physiology Volume 31B: Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals**. [s.l: s.n.].

YOKEL, R. A.; MACPHAIL, R. C. Engineered nanomaterials: Exposures, hazards, and risk prevention. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 7, 2011.

ZHENG, J. et al. Effect of waterborne zinc exposure on metal accumulation , enzymatic activities and histology of *Synechogobius hasta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 1864–1873, 2011.

ZHOU, Y. et al. Copper bioaccumulation and biokinetic modeling in marine herbivorous fish *Siganus oramin*. **Aquatic Toxicology**, v. 196, n. January, p. 61–69, 2018.